



TOR VERGATA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in
Medicina e Chirurgia

Presidente del Corso di Laurea Prof. Roberto Bei
Cattedra di Nefrologia
Direttore Prof.ssa Anna Paola Mitterhofer

Tesi di Laurea Sperimentale in
Nefrologia

“POTENZIALI EFFETTI BENEFICI DI UN
INTEGRATORE NATURALE IN PAZIENTI POST
COVID-19”

RELATORE:
Chiar. ma Prof.ssa Annalisa Noce

LAUREANDA:
Irene Pandolfi

CORRELATORE:
Dott.ssa Giulia Marrone

ANNO ACCADEMICO 2022 -2023

*“Se io potrò impedire a un cuore di spezzarsi
non avrò vissuto invano
Se allevierò il dolore di una vita
o guarirò una pena
o aiuterò un pettirosso caduto
a rientrare nel nido
non avrò vissuto invano”*

INDICE

I. INTRODUZIONE.....	4
1. COVID-19.....	6
1.1 Epidemiologia, storia ed evoluzione del virus	6
1.2 Patogenesi	13
1.3 Clinica e trasmissione del virus	22
1.4 Diagnostica	38
2. Sindrome Long-COVID	47
2.1 Definizione e fattori di rischio.....	47
2.2 Fisiopatologia	50
2.3 Clinica	59
2.4 Monitoraggio e gestione clinica dei pazienti affetti da sindrome Long-COVID	72
3. Potenziali effetti benefici dei composti naturali bioattivi nelle patologie infettive ed infiammatorie	76
II. PARTE SPERIMENTALE.....	86
1. Obiettivo dello studio.....	86
2. Pazienti e Metodi.....	86
3. Analisi Statistica.....	90
4. Risultati.....	90
5. Discussione e conclusioni.....	100
III. LISTA ABBREVIAZIONI	104
IV. BIBLIOGRAFIA	109
V. RINGRAZIAMENTI	144

I. INTRODUZIONE

Il Coronavirus Disease (COVID-19) ha travolto il mondo per più di due anni causando una pandemia che ha avuto un impatto decisivo sulla storia collettiva ed individuale, profilando uno scenario di emergenza epocale e causando danni incommensurabili che si sono inevitabilmente ripercossi sulle vite e sulla salute fisica e mentale della maggior parte della popolazione globale.

“COVID-19” è l’acronimo che dà il nome alla malattia, dove 'CO' si riferisce a 'corona' (ossia l’aspetto che assume il virus dato dalle proteine che emergono dall’involucro lipidico che circonda il genoma, creando delle punte *-spike-*), 'VI' sta per virus, 'D' per “*disease*”, malattia e '19' indica l’anno in cui il virus è stato isolato per la prima volta, ossia il 2019 [Harvey TS, Pathogens, 2023]. La patologia indotta da SARS-CoV-2 (acronimo che sta per Sindrome Respiratoria Severa Acuta da Coronavirus 2) è infatti provocata dal nuovo coronavirus, un virus a RNA appartenente al gruppo dei beta-coronavirus insieme al SARS-CoV (Sindrome Respiratoria Severa Acuta da Coronavirus), responsabile della sindrome respiratoria acuta grave (SARS) ed al MERS-CoV (Sindrome respiratoria mediorientale da Coronavirus), responsabile della sindrome respiratoria mediorientale (MERS) [Harvey TS, Pathogens, 2023].

Sono state identificate sei specie di coronavirus in grado di causare malattie negli esseri umani, dove sono maggiormente coinvolti il sistema neurologico, respiratorio, enterico ed epatico.

Il virus SARS-CoV-2 è, quindi, un nuovo ceppo virale che ha determinato l’insorgere del primo focolaio della patologia, inizialmente presentata come polmonite di eziologia sconosciuta, in un gruppo di pazienti a Wuhan, Cina [Hassan SA et al, Cureus, 2020].

La pandemia da COVID-19 è tra le malattie infettive più letali emerse nella storia recente. Dati virologici, epidemiologici, veterinari ed ecologici stabiliscono che il SARS-CoV-2, si sia evoluto direttamente o indirettamente da un β -coronavirus appartenente al sottogenere sarbecovirus (virus simili alla SARS) che infettano naturalmente pipistrelli e pangolini in Asia e Sud-Est asiatico. Gli scienziati hanno avvertito per decenni che tali sarbecovirus sarebbero emersi ancora, per cui hanno identificato i fattori di rischio e hanno fortemente incentivato l’attivazione di maggiori

misure preventive. Sfortunatamente, poche di queste azioni preventive sono state intraprese, tant'è che il COVID-19 si è diffuso rapidamente sotto forma di pandemia [Morens DM et al, Am J Trop Med Hyg, 2020].

Ancora oggi, nonostante gli sforzi globali intrapresi per studiare e approfondire i diversi aspetti del virus, tra cui le manifestazioni cliniche, l'epidemiologia, la mortalità, la morbilità e la diagnosi, persistono ancora grandi insidie nella conoscenza di questa malattia e molti aspetti rimangono poco chiari. Per questo motivo, il monitoraggio e l'indagine periodica dell'infezione sono una questione essenziale, anche perché il rischio di insorgenza di nuovi focolai rimane elevato. È necessario intraprendere sinergiche azioni scientifiche, sanitarie e sociali, tra cui un significativo aumento dei finanziamenti per la ricerca di base e applicata che affronta l'emergenza delle diverse patologie, per scongiurare che questa tragica storia possa ripetersi in futuro [Morens DM et al, Am J Trop Med Hyg, 2020].

1. COVID-19

1.1 Epidemiologia, storia ed evoluzione del virus

Dopo tre anni di pandemia, è chiaro che il virus SARS-CoV-2 abbia rappresentato un punto di svolta per l'umanità, sia nei Paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo [Arnedo-Pena A et al, *Epidemiologia (Basel)*, 2023].

Si stima che nel 2021 più del 40% della popolazione mondiale sia stata infettata dal virus [Halaji M et al, *J Res Med Sci*, 2021].

A livello globale, fino al 10 Febbraio 2021, sono stati segnalati 106.797.721 casi di infezione, tra cui 2.341.145 decessi, con incidenza di infezione in continuo aumento [Hu B et al, *Nat Rev Microbiol*, 2021].

Inoltre, la pandemia ha causato danni sostanziali in tutto il mondo, con differenze significative tra Paesi per quanto concerne i tassi di incidenza e di mortalità, direttamente proporzionali alle misure di prevenzione intraprese e alla disponibilità delle vaccinazioni. Di conseguenza, lo scenario che si è profilato è stato quello in cui Paesi a basso reddito e gruppi vulnerabili sono stati inevitabilmente i più colpiti [Arnedo-Pena A et al, *Epidemiologia (Basel)*, 2023; Aung MN et al, *J Egypt Public Health Assoc*, 2021; Dang HH et al, *PLoS One*, 2022].

A fine Dicembre 2019, negli ospedali di Wuhan, in Cina, sono stati riportati casi insoliti di polmonite [Halaji M et al, *J Res Med Sci*, 2021]. Analogamente ai pazienti affetti da SARS e MERS, questi pazienti presentavano sintomi di polmonite virale, tra cui febbre, tosse, malessere toracico, e, nei casi più gravi, dispnea e infiltrazione polmonare bilaterale [Hu B et al, *Nat Rev Microbiol*, 2021; Zhu N et al, *N Engl J Med*, 2020; Gralinski LE et al, *Viruses*, 2020].

Studi successivi hanno poi individuato come focolaio d'origine della malattia il mercato alimentare nella città di Wuhan, nella provincia di Hubei, nella Cina centrale ("Huanan Seafood Wholesale Market") [Halaji M et al, *J Res Med Sci*, 2021]. Si tratta di un mercato alimentare all'ingrosso dove è possibile acquistare anche animali vivi, tra cui pollame e animali selvatici [Hu B et al, *Nat Rev Microbiol*, 2021; Deng SQ et al, *J Clin Med*, 2020; Jiang S et al, *Emerg Microbes Infect*, 2020].

Secondo uno studio retrospettivo, l'insorgenza del primo caso noto risale all'8 Dicembre 2019 [Wu Z et al, *JAMA*, 2020].

Il 31 Dicembre, la Commissione sanitaria municipale di Wuhan ha notificato al pubblico un focolaio di polmonite di causa non identificata e ha informato l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) [Hu B et al, Nat Rev Microbiol, 2021; Wu Z et al, JAMA, 2020]. Attraverso il sequenziamento dell'RNA metagenomico e l'isolamento del virus da campioni di liquido di lavaggio broncoalveolare di pazienti con polmonite grave, un team di scienziati cinesi ha identificato come agente causale di questa nuova patologia un beta-coronavirus mai visto prima [Zhu N et al, N Engl J Med, 2020; Wu F et al, Nature, 2020 ; Zhou P et al, Nature, 2020].

Il 2 Gennaio 2020, è stato identificato il nuovo coronavirus, inizialmente chiamato nCoV-2019 (nuovo coronavirus 2019) [Halaji M et al, J Res Med Sci, 2021], mentre, il 9 gennaio 2020, il risultato di questa identificazione eziologica è stato annunciato pubblicamente [Hu B et al, Nat Rev Microbiol, 2021].

Successivamente, sono stati identificati altri pazienti senza storia di esposizione all' "Huanan Seafood Wholesale Market" [Hu B et al, Nat Rev Microbiol, 2021]. Sono stati segnalati diversi cluster familiari di infezione e si sono verificate infezioni nosocomiali anche in strutture sanitarie. Tutti questi casi hanno fornito una chiara evidenza della trasmissione da uomo a uomo del nuovo virus e i viaggi tra città hanno facilitato la trasmissione del virus in Cina. La nuova polmonite da coronavirus si è presto diffusa in altre città della provincia di Hubei e in altre parti della Cina. In un mese, il virus si è diffuso massicciamente in tutte le 34 province della Cina. Il numero di casi confermati è aumentato improvvisamente, con migliaia di nuovi casi diagnosticati ogni giorno alla fine di gennaio [Hu B et al, Nat Rev Microbiol, 2021].

Il 30 Gennaio, l'OMS ha dichiarato l'epidemia di nuovo coronavirus un'emergenza di salute pubblica di rilevanza internazionale [Hu B et al, Nat Rev Microbiol, 2021].

L'11 Febbraio 2020 l'OMS ha approvato i risultati dell'isolamento del genoma e del sequenziamento genomico del nCoV-2019 [Hoffmann M et al, Cell, 2020]. Il Comitato internazionale per la tassonomia dei virus ha definito il nuovo coronavirus "SARS-CoV-2" e l'OMS ha denominato la malattia "COVID-19" [Halaji M et al, J Res Med Sci, 2021]. È stato, quindi, individuato come virus responsabile della patologia il SARS-CoV-2, un virus RNA a singolo filamento positivo, appartenente al regno di Riboviria, Orthornavirae, Pisuviricota Phylum, classe Pisoniviricetes, ordine di Nidovirales, famiglia Coronaviridae, Sottofamiglia Coronavirinae e genere beta-coronavirus (β -CoV), sottogenere Sarbecovirus, e SARS-correlati specie coronavirus [Hoffmann M et al, Cell, 2020].

L'epidemia di COVID-19 in Cina ha raggiunto il picco epidemico a Febbraio e, a partire dalla fine dello stesso mese, la diffusione internazionale della patologia ha subito una forte accelerazione, dovuta sia all'elevata efficienza di trasmissione del SARS-CoV-2, e sia all'abbondanza di viaggi internazionali [Hu B et al, Nat Rev Microbiol, 2021].

L'11 Marzo 2020, l'OMS ha ufficialmente definito l'epidemia globale di COVID-19 come una pandemia [Hu B et al, Nat Rev Microbiol, 2021].

Da Marzo, mentre la diffusione del virus in Cina è stata efficacemente arginata, il numero di casi in Europa, negli Stati Uniti e in altri Paesi ha subito un'impennata [Hu B et al, Nat Rev Microbiol, 2021].

Ad Agosto 2020, 216 Paesi e regioni di tutti e sei i continenti avevano segnalato più di 20 milioni di casi di COVID-19 con più di 733.000 morti. L'elevata mortalità si è verificata soprattutto in concomitanza di un forte sovraccarico del sistema sanitario dovuto allo stato di emergenza [Halaji M et al, J Res Med Sci, 2021]. Pertanto, il COVID-19 riveste, ad oggi, un posto significativo nel novero delle malattie respiratorie, a causa dei tassi più elevati di trasmissibilità, ospedalizzazione, ricovero in unità di terapia intensiva, gravità della malattia e mortalità [Bulut C et al, Turk J Med Sci, 2020].

Il periodo di incubazione del COVID-19 è stato definito di 5,2 giorni, 5,1 giorni e 4 giorni in tre studi separati. Tuttavia, in un gruppo familiare di 5 pazienti, questo periodo è stato riportato tra 1 e 19 giorni. Questi dati dimostrano che il periodo di incubazione del COVID-19 è simile a quello della MERS e della SARS ed è leggermente più lungo di quello dell'influenza [Jiang X et al, J Med Virol, 2020].

Tutti i precedenti coronavirus umani altamente patogeni hanno avuto un'origine zoonotica. Il SARS-CoV, che condivide circa il 79% di omologia a livello di sequenza nucleotidica con il SARS-CoV-2, è stato collegato ad animali vivi venduti nei mercati di Foshan, provincia di Guangdong, Cina [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023; Guan Y et al, Science, 2003; Song HD et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2005].

Diversi anni di ricerche sugli animali selvatici hanno rivelato che i pipistrelli sono il principale serbatoio di molti virus simili alla SARS, compreso il SARS-CoV-2 [Li W et al, Science, 2005].

La prima prova è stata l'isolamento dei virus parenti più stretti del SARS-CoV, ma anche del SARS-CoV-2, da pipistrelli a ferro di cavallo (*Rhinolophus*) che colonizzano grotte nella provincia dello Yunnan, nella Cina continentale. Tuttavia, il notevole divario geografico tra le grotte dello Yunnan e il luogo della prima comparsa

di SARS-CoV e SARS-CoV-2 evidenzia quale sia la difficoltà di tracciare con precisione i movimenti del virus da un punto di vista epidemiologico e l'importanza di campionare altre regioni e paesi. A questo proposito, virus più strettamente correlati al SARS-CoV-2 rispetto a quelli della regione dello Yunnan sono stati documentati nei pipistrelli ma anche nei pangolini di diverse località del Sud-Est asiatico, tra cui Cina, Thailandia, Cambogia e Giappone [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023; Wacharapluesadee S et al, Nat Commun, 2021].

Poiché esiste un notevole divario evolutivo tra il SARS-CoV-2 e i virus animali più vicini, è improbabile che il SARS-CoV-2 sia passato direttamente dai pipistrelli all'uomo. Probabilmente, l'evento o gli eventi di salto di specie si sono verificati nel contesto di luoghi in cui la popolazione ad alta densità è in contatto con animali vivi suscettibili all'infezione da SARS-CoV-2. Ecco perché il mercato di Wuhan è stato identificato come primo e principale epicentro della diffusione del virus [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023].

Un aspetto importante è, quindi, la trasmissione interspecie. Infatti, il SARS-CoV-2 può essere trasmesso da uomo ad animale, come è stato documentato nei visoni d'allevamento, nei cani, nei gatti, nei leoni e nelle tigri degli zoo. In caso di infezione animale, il virus umano può evolvere e adattarsi al nuovo ospite. L'evoluzione virale si è verificata nei visoni nei Paesi Bassi e in Danimarca, dove il trasferimento da uomo a animale ha portato all'introduzione di una mutazione adattativa nel dominio di legame del recettore RBD (receptor-binding domain) della proteina virale spike. Una tirosina è stata sostituita da una fenilalanina in posizione 453 (Y453F), causando un aumento dell'affinità della proteina spike per il recettore di ingresso virale ACE2 (enzima 2 convertitore dell'angiotensina) [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023; Oude Munnink BB et al, Science, 2021].

Inoltre, l'infezione degli animali con il SARS-CoV-2 umano può rappresentare un problema serio, in quanto possono verificarsi eventi di ricombinazione tra i Coronavirus animali e umani per generare nuovi virus ibridi con potenziale pandemico se si diffondono nell'uomo senza immunità o con immunità parziale [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023].

Il SARS-CoV-2, come tutti i virus a RNA, è incline ad accumulare mutazioni nel suo genoma durante ogni ciclo di replicazione. Tuttavia, i coronavirus codificano una esonucleasi da 3' a 5' che consente una replicazione ad alta fedeltà da parte della RNA

polimerasi virale RNA-dipendente [Denison MR et al, RNA Biol, 2011; Smith EC et al, Annu Rev Virol, 2014; Holmes EC, Trends Microbiol, 2003].

Il SARS-CoV-2 si replica in modo molto efficiente negli ospiti infetti, come dimostrato dalle elevate cariche virali misurate nei tamponi nasofaringei [Wölfel R et al, Nature, 2020].

Da Dicembre 2019 a Novembre 2020, il tasso di evoluzione del SARS-CoV-2 suggerisce che il suo genoma acquisisce circa 2 mutazioni al mese. Tuttavia, nel corso della pandemia sono emerse diverse mutazioni, in particolare nella proteina spike, il che implica che il tasso di evoluzione del SARS-CoV-2 è superiore a quello previsto. Alla fine di Febbraio 2020 è stata rilevata una singola sostituzione non sinonima di un acido aspartico in glicina nella proteina spike in posizione 614 (D614G) (**Figura 1**) [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023].



Figura 1: Prima rilevazione di varianti significative di SARS-CoV-2, Paesi e date. Immagine tratta da un lavoro di Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023

Una minoranza delle sequenze (5%) disponibili nella banca dati, in particolare nell'Europa meridionale, presentava la 614G, ma con la diffusione del virus, questa variante è diventata il genotipo più diffuso a livello mondiale. È importante notare che gli studi in vitro hanno dimostrato che il residuo glicinico in posizione 614 conferisce una maggiore efficienza nell'ingresso e nella replicazione virale rispetto a spike con il residuo acido aspartico. Nonostante l'aumento dell'infettività e della carica virale nelle persone infette, non è stato osservato un aumento della gravità della malattia COVID-19 in associazione alla mutazione D614G, sebbene i tassi di infezione siano stati estesi ai pazienti più giovani. È importante notare che la variante D614G è rimasta sensibile all'attività neutralizzante dei sieri di individui che hanno ricevuto una preparazione vaccinale basata sulla sequenza originale di Wuhan spike e sugli anticorpi monoclonali umani che hanno come target la proteina spike [Korber B et al, Cell, 2020; Plante JA et al, Nature, 2021; Volz E et al, Nature, 2021; Liu Y et al, N Engl J Med, 2021].

Nel Settembre 2020, l'analisi del continuo aumento dei dati genomici ha evidenziato l'emergere di sequenze caratterizzate da un maggior numero di mutazioni rispetto al precedente SARS-CoV-2 circolante. Nel Regno Unito (UK) è stato identificato un nuovo lignaggio definito come B.1.1.7. (**Figura 1**) Questa nuova variante è stata caratterizzata da 14 sostituzioni non sinonime e 6 sinonime e da 3 delezioni lungo l'intero genoma, che sono state mappate in un singolo ramo monofiletico dell'albero filogenetico. Otto di queste mutazioni, comprese le sostituzioni e le delezioni, erano posizionate nella proteina spike che interagisce con il recettore cellulare per mediare l'ingresso del virus nelle cellule bersaglio. Degna di nota è la mutazione nella posizione 501 della proteina spike, dove un residuo di asparagina viene trasformato in un residuo di tirosina (N501Y). Questa posizione è il principale residuo di contatto nella RBD ed è stato dimostrato che aumenta di sei volte l'affinità di spike per ACE2 [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023; Gu H et al, Science, 2020].

La comparsa della variante B.1.1.7 ha aperto la strada a una maggiore attenzione all'evoluzione della SARS-CoV-2, poiché nel novembre 2020 il virus aveva iniziato a mutare in modo più drastico. Sono iniziate ad emergere varianti di preoccupazione (VOC) con mutazioni rilevanti nella proteina spike, caratterizzate da una maggiore trasmissibilità e da cambiamenti nell'antigenicità, aumentando così il livello di minaccia per la salute pubblica [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023].

Le tre VOC più importanti provengono da Sudafrica (B.1.351), Brasile (P.1) e India (B.1.617.2) (**Figura 1**). Tuttavia, è emersa un'abbondanza di varianti di interesse (VOI), tra cui B.1.525 (Nigeria), B.1.526 (New York), B.1.427/B.1.429 (California), B.1.258 (Scozia) e A.23.1 (Liverpool), che, nel complesso, rappresentano ora più del 90% dei virus sequenziati. Data la complessità delle molteplici varianti, di recente l'OMS ha modificato la nomenclatura dei VOC e dei VOI con le lettere dell'alfabeto greco, rinominando B.1.1.7 come Delta, B.1.351 come Beta, P.1 come Gamma e B.1.617.2 come Delta (**Figura 1**) mentre i VOI sono stati rinominati B.1.525 come Eta, B.1.526 come Iota, B.1.617.1 come Kappa, C.37 come Lambda e B.1.621 come Mu [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023; Mlcochova P et al, Nature, 2021; Rambaut A et al, Nat Microbiol, 2020].

Degna di nota è la variante Delta, emersa in India alla fine del 2020 e che, da allora, si è diffusa diventando la variante predominante in Europa e nel mondo [Cherian S et al, Microorganisms, 2021; Torjesen I, BMJ, 2021; Chakraborty C et al, mBio, 2021].

I dati epidemiologici indicano la variante Delta si replica in modo più efficiente rispetto alle varianti precedenti, come dimostrato dalle cariche virali nel tampone nasofaringeo, riportate a circa 1000 volte superiori a quelle dell'infezione con le varianti precedenti [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023; Li B et al, Nat Commun, 2022].

La maggiore efficienza di Delta nell'infectare e replicare è spiegata da una serie di tre mutazioni nella RBD di spike. In primo luogo, una mutazione da lisina ad asparagina in posizione 417 è presente in alcune sequenze, ma non in tutte. Questa mutazione è stata associata a cambiamenti conformazionali nella proteina spike, che possono portare all'evasione immunitaria. La seconda mutazione, una sostituzione da leucina ad arginina in posizione 452, aumenta l'affinità per il recettore ACE2 e la terza, una sostituzione da treonina a lisina in posizione 478, è comune alla linea B.1.1.519 ed è stata anch'essa prevista per aumentare l'affinità di legame RBD/ACE2 e consentire l'evasione immunitaria. Inoltre, in posizione 681, adiacente al sito di clivaggio della furina della proteina spike, è presente una sostituzione tra prolina e arginina che aumenta l'efficienza del suo clivaggio per mediare la fusione virale e avviare l'infezione [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023].

Un'ulteriore variante denominata B.1.1.529, è stata individuata per la prima volta in Botswana e Sudafrica nel novembre 2021 e successivamente ribattezzata Omicron (*Figura 1*) [Viana R et al, Nature, 2022].

Questa variante ha immediatamente destato preoccupazione per l'elevato numero di mutazioni, in particolare nella proteina spike. Sono stati rilevati molteplici cambiamenti all'interno delle due regioni immunogene in S1 dominio N-terminale (NTD) e RBD, tra cui un'inserzione di 3 aminoacidi e un accumulo di mutazioni in prossimità del sito di clivaggio della furina, tra cui la combinazione di mutazioni N679K e P681H. Nel complesso, queste mutazioni rendono questo virus più infettivo rispetto alle varianti precedenti. Tuttavia è stato dimostrato che Omicron causa una malattia attenuata rispetto alle varianti D614G e Beta, a causa di una ridotta capacità di diffusione nel tratto respiratorio inferiore. È importante sottolineare che le mutazioni di Omicron hanno abbassato di circa 22 volte l'attività di neutralizzazione degli anticorpi ottenuti con la vaccinazione, rendendo la popolazione umana più suscettibile all'infezione [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023].

La rapida diffusione di Omicron ha sostituito la precedente variante Delta in poche settimane in tutto il mondo e sono stati rilevati segni di evoluzione virale determinati dall'emergere di sottovarianti [Pagani I et al, Eur Phys J Plus, 2023].

1.2 Patogenesi

Il SARS-CoV-2 è un virus a RNA a singolo filamento positivo che contiene quattro principali tipi di proteine: nucleocapside, membrana, involucro e proteine spike.

La proteina spike, principale fattore di virulenza della SARS-CoV-2, è un elemento chiave per l'attacco virale alle cellule bersaglio. Le proteine spike sono proteine di fusione virale di classe I, presenti come omotrimeri sporgenti sulla superficie virale e facilitano l'ingresso del virus nelle cellule ospiti bersaglio attraverso i recettori di superficie ACE2, i recettori TMPRSS2 (serin proteasi-2 transmembrana) e la vimentina extracellulare [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

Una proteina spike isolata contiene una terminazione N extracellulare, un dominio transmembrana fissato nella membrana del virus e un breve segmento C-terminale intracellulare [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023]. La subunità S1 permette il legame del recettore ACE2 alla cellula ospite, mentre la subunità S2 consente la fusione e l'ingresso del virus, poichè viene scissa dalla TMPRSS2, facilitando così la fusione virale con la membrana cellulare [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022; Lan J et al, Nature, 2020].

La proteina spike può essere rilasciata dalla stessa cellula ospite attraverso vescicole extracellulari (EVs) e diffondersi attraverso il sistema circolatorio a tessuti e organi distanti. Le EVs sono strutture bilayer lipidiche legate alla membrana rilasciate da cellule ospiti, come neutrofili, monociti, linfociti, piastrine, cellule epiteliali e cellule endoteliali (ECs), in condizioni fisiologiche e patologiche. Queste vescicole possono contenere composti biologicamente attivi, come mRNA, DNA, lipidi e proteine assortite. Le EVs condividono anche alcune somiglianze con i virus, come le piccole dimensioni, il meccanismo di biogenesi e il meccanismo di ingresso nella cellula [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

Una volta che la proteina spike si è attaccata alla cellula ospite e la replicazione è completa, il SARS-CoV-2 germoglia nel compartimento intermedio del reticolo endoplasmatico-Golgi (ERGIC) o nell'apparato del Golgi. Infine, il SARS-CoV-2 può uscire dalla cellula attraverso una via secretoria biosintetica (**Figura 2**) [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

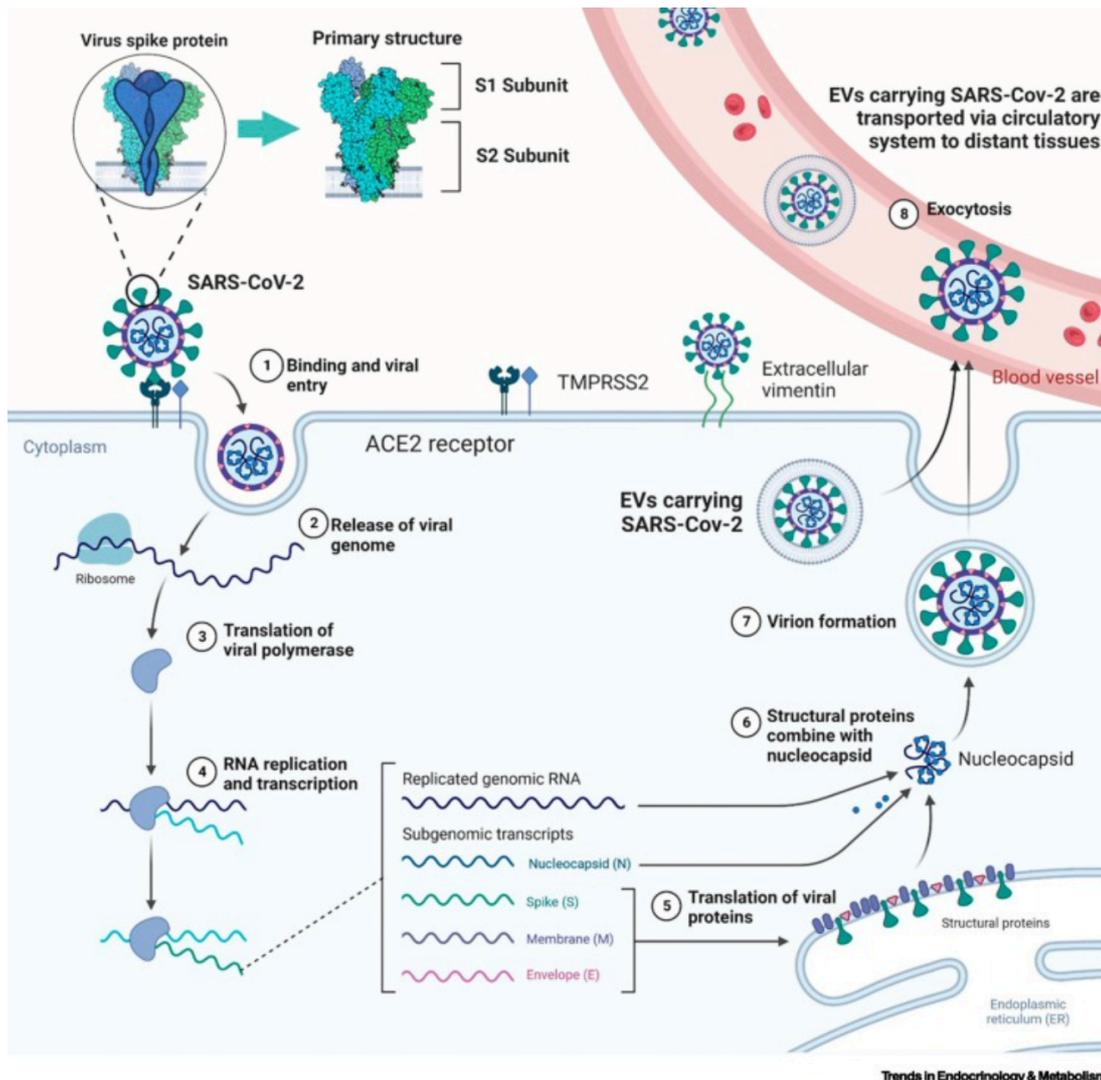


Figura 2: SARS-CoV-2: legame con il recettore, ingresso nella cellula ospite, replicazione e trasporto in altri tessuti. Immagine tratta da un lavoro di Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023.

La carica virale è maggiore nei tessuti che esprimono sia ACE2 che TMPRSS2, come gli epitelii dell'albero tracheobronchiale, gli pneumociti di tipo 2 (cellule AT2), le cellule endoteliali, i cardiomiociti e le cellule epiteliali dell'intestino tenue e del colon. Vi è, quindi, una differente distribuzione della suscettibilità cellulare nei diversi organi, che, pertanto, spiega la localizzazione dei sintomi comunemente riscontrati nei pazienti [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022; Hoffmann M et al, Cell, 2020]. Oltre ad ACE2 e TMPRSS2, altre proteine possono facilitare l'ingresso del virus in modo sito-specifico. L'ACE2 è espresso in combinazione con la catepsina L negli pneumociti

alveolari di tipo 1 (cellule AT1) e AT2, negli enterociti, nei cardiomiociti e nella placenta [Li Y et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2021].

Le catepsine attivano cascate infiammatorie che causano l'apoptosi delle cellule e svolgono ruoli importanti nel rimodellamento della matrice, nel reclutamento dei neutrofili e nella mielopoiesi di emergenza. L'attaccamento virale alla cellula è facilitato dall'eparan solfato, mentre i siti di clivaggio furin-like sulla proteina spike promuovono la replicazione virale nel polmone [Chu H et al, Nat Commun, 2021]. La neuropilina1 (NRP1) lega questi substrati derivati dalla furina e favorisce l'ingresso virale nelle cellule nasali. L'ACE2 può essere espresso in combinazione con proteasi pro-infiammatorie (ad esempio, furina, PCSK5, proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 5, e PCSK7, proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 7) [Borcuk AC et al, J Biomed Sci, 2022; Cantuti-Castelvetri L et al, Science, 2020; Muus C et al, Nat Med, 2021].

Dagli esami ematochimici dei pazienti affetti da SARS-CoV-2 si osserva generalmente un aumento dei livelli plasmatici di citochine pro-infiammatorie, oltre ad alterazioni nel numero dei leucociti, di cui il 70% neutrofili. Inoltre, è stato anche osservato un incremento dei livelli di proteina C-reattiva (PCR) nel sangue. Sono stati osservati anche un'elevata velocità di eritrosedimentazione (VES) e valori elevati di D-dimero. [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020]. Sono, inoltre, stati riscontrati livelli ematici significativamente elevati di citochine e chemochine, tra cui nel dettaglio IL1- β (interleuchina 1- β), IL1RA (interleuchina 1 Receptor Antagonist), IL7 (interleuchina 7), IL8 (interleuchina 8), IL9 (interleuchina 9), IL10 (interleuchina 10), FGF2 (fibroblast growth factor 2) di base, GCSF (granulocyte- colony stimulating factor) , GMCSF (granulocyte- macrophage colony- stimulating factor), IFN γ (interferone gamma), IP10 (interferon- gamma inducible protein 10), MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1) , MIP1 α (macrophage inflammatory protein-1 alpha), MIP1 β (macrophage inflammatory protein-1 beta) , PDGFB (fattore di crescita derivato dalle piastrine subunità B) , TNF α (fattore di necrosi tumorale alpha) e VEGFA (fattore di crescita-A dell'endotelio vascolare). Nei casi più severi, che hanno richiesto il ricovero in terapia intensiva, sono stati riscontrati anche alti livelli di citochine pro-infiammatorie, tra cui IL2 (interleuchina 2), IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1 α e TNF α , che si ritiene favoriscano la gravità della malattia [Huang C et al, Lancet, 2020].

Da questo quadro si evincono gli aspetti salienti che costituiscono gli snodi nella patogenesi del virus, e che sono alla base del danno d'organo che può verificarsi nei casi più gravi di infezione da SARS-CoV-2.

I meccanismi alla base delle varie manifestazioni dell'infezione non sono completamente noti, ma la maggior parte dei dati suggerisce che vi siano perturbazioni del sistema immunitario causate dal virus e dal conseguente danno tissutale [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Le risposte aberranti legate all'interferone (IFN) portano ad alterazioni nell'elaborazione delle citochine che impoveriscono le cellule immunitarie residenti, reclutando contemporaneamente macrofagi iperattivi e neutrofili funzionalmente alterati, spostando così l'equilibrio dall'immunità adattativa a quella innata. L'attivazione sproporzionata di macrofagi e neutrofili riduce ulteriormente la normale attività dei linfociti B, dei linfociti T e delle cellule natural killer (NK). Inoltre, questo stato pro-infiammatorio stimola l'attivazione incontrollata del complemento e lo sviluppo di trappole extracellulari per neutrofili (NET), che promuovono la cascata della coagulazione e inducono uno stato di "trombo-infiammazione". Queste perturbazioni hanno manifestazioni simili in più apparati, che spesso mostrano reperti patologici legati a lesioni microvascolari e trombosi di vasi grandi e piccoli. In particolare, nei pazienti più gravi, ad essere coinvolti sono prevalentemente i polmoni rispetto agli altri organi. Oltre alle trombosi infiammatorie e alle lesioni endoteliali, gran parte del danno parenchimale deriva dalla mancata maturazione degli pneumociti alveolari, dalle interazioni tra pneumociti di tipo 2 e macrofagi non residenti e da un maggior grado di formazione di NET [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020; Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Come accennato in precedenza, alla base della patogenesi vi sono perturbazioni del sistema immunitario causate dal virus e conseguente danno tissutale [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

I punti cardine nell'ambito della patogenesi possono essere così schematizzati:

Risposte aberranti legate all' IFN: queste sono alla base della difesa dell'ospite contro le infezioni virali.

Gli interferoni sono classificati come tipi I, II e III: gli IFN di tipo I si legano al recettore IFN- α/β (interferone alpha/beta), gli IFN di tipo II (IFN- γ) sono attivati

dall'IL-12 (interleuchina 12) e gli IFN di tipo III segnalano attraverso i complessi IL-10R2 (subunità 2 del recettore IL-10) o IFNLR-1 (recettore 1 dell'interferone lambda) [Borzuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Sebbene gli IFN siano componenti importanti della lotta contro le infezioni virali, possono anche promuovere lesioni tissutali quando sono presenti in eccesso [Unterman A et al, Nat Commun, 2022].

I livelli di interferone variano tra i diversi tessuti e tendono a correlarsi con la gravità della malattia tra i pazienti affetti da COVID-19. Le risposte di tipo I legate all'IFN sono importanti nelle prime fasi dell'infezione, anche se sono persistentemente elevate nei pazienti con replicazione virale sostenuta. L'aumento dell'IFN di tipo II è associato alla malattia grave in tutti i siti, mentre l'IFN di tipo III è presente soprattutto nelle vie aeree superiori dei pazienti con malattia lieve e cariche virali elevate. È possibile che le risposte legate all'IFN di tipo III nelle vie aeree superiori siano responsabili dell'eliminazione del SARS-CoV-2, ma quando gli agenti antivirali falliscono, l'equilibrio si sposta verso uno stato pro-infiammatorio sostenuto dagli IFN di tipo I e II nelle vie aeree inferiori [Borzuk AC et al, J Biomed Sci, 2022; Sposito B et al, Cell, 2021].

Dati ottenuti da modelli animali supportano l'idea che quadri più severi di COVID-19 si manifestino quando avviene il fallimento delle attività antivirali guidate dall'IFN. [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020; Borzuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Alterazioni delle citochine, tempesta citochinica: si verifica un aumento dei livelli di citochine, in particolare IL-1 β , IL-1RA, TNF α , GCSF, CCL7 (ligando della chemochina 7), CXCL1 (ligando della chemochina 1), CXCL8 (interleuchina 8), CXCL11 (ligando della chemochina 11) e CXCL12a (ligando della chemochina 12a) [Cambier S et al, JCI Insight, 2022]. I pazienti con quadri severi di COVID-19 presentano tipicamente un incremento dei livelli sierici di IL6 (interleuchina 6), IL-8/CXCL8, CXCL9 (ligando della chemochina 9) , CXCL10 (ligando della chemochina 10), TNF α , MCP1/CCL2 (ligando della chemochina 2), RANTES/CCL5 (ligando della chemochina 5), IL18 (interleuchina 18) e MIP1 α /CCL3 (ligando della chemochina 3), che a loro volta promuovono uno stato pro-infiammatorio che può persistere fino a sessanta giorni [Borzuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Si va, quindi, incontro a uno stato di infiammazione cronica e disregolazione immunitaria. Il rilascio di molecole infiammatorie, come citochine, interleuchine e

chemochine da parte del sistema immunitario in risposta al virus, è un evento noto come tempesta citochinica ed è caratteristico della patogenesi del COVID-19. Con l'intensificarsi della tempesta di citochine, aumentano drasticamente i livelli di molecole infiammatorie, come l'amiloide A sierica (SAA), il fattore di von Willebrand (vWF), l'IL6, l'IL8, l'IL10 e il TNF α [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

Reclutamento di cellule immunitarie funzionalmente alterate e attivazione incontrollata del complemento, con relative NET e trombosi sistemica: l'infezione da SARS-CoV-2 promuove uno squilibrio tra immunità innata e adattativa che si accentua quando i pazienti sviluppano sintomi gravi [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020; Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

La malattia lieve è caratterizzata da una risposta immunitaria adattativa con un robusto reclutamento di cellule T CD8⁺ [Bergamaschi L et al, Immunity, 2021].

La malattia più grave, invece, è caratterizzata da una predominanza dell'immunità innata con l'elaborazione di citochine infiammatorie (ad esempio, IL6, IL1- β e TNF α) accompagnate da linfopenia e da una diminuzione di linfociti B e T [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023]. I pazienti con COVID-19 grave presentano anche un aumento del numero di neutrofili a bassa densità, che comprendono un sottogruppo di granulociti disfunzionali che aumenta nelle condizioni autoimmuni e in altri disturbi infiammatori. I neutrofili a bassa densità promuovono le lesioni tissutali contribuendo alla soppressione immunitaria, inducendo la trombosi e facilitando la formazione di NET. [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022; Morrissey SM et al, JCI Insight, 2021; Cabrera LE et al, PLoS Pathog, 2021].

Le cellule epiteliali elaborano anche MCP1/CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL10, IL8/CXCL8, IL-1 β e TNF α ; queste citochine reclutano i macrofagi e promuovono ulteriormente il danno tissutale [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Con il progredire della malattia, i macrofagi alveolari normali vengono infine esauriti e sostituiti da macrofagi pro-infiammatori [Speranza E et al, Sci Transl Med, 2021].

L'infezione grave da SARS-CoV-2 causa una diminuzione sproporzionata dei linfociti T CD4⁺, accompagnata da alterazioni delle sottopopolazioni di cellule T. I pazienti infetti presentano un aumento del rapporto tra cellule CD4⁺ T naïve e cellule CD4⁺ della memoria e una diminuzione delle popolazioni di cellule T-regolatorie, in

particolare quelle che modulano le risposte allergiche e l'autoimmunità. Inoltre, l'infezione da SARS-CoV-2 stimola le cellule Th1, Th2 e Th17, il cui effetto netto è l'elaborazione di citochine pro-infiammatorie, come IL17 (interleuchina 17), IL21 (interleuchina 21), IL22 (interleuchina 22) e GCSF [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Le alterazioni delle cellule T si verificano in combinazione con una ridotta evoluzione delle cellule B nei centri germinali. I monociti circolanti anormali elaborano S100A8 (proteina legante il calcio A8) e S100A9 (proteina legante il calcio A9), che guidano la mielopoiesi di emergenza, sopprimono la normale funzione delle cellule T e ritardano la clearance virale. L'aumento dei livelli di IFN- α attiva anche le cellule NK per promuovere risposte mediate dall'interferone che, se sostenute, possono portare alla disfunzione e alla perdita delle cellule NK. Infatti, i dati emergenti suggeriscono che il COVID-19 grave può derivare da una risposta immunitaria compromessa con una clearance virale ritardata: la mancanza di clearance virale nelle vie aeree superiori consente l'ingresso del virus nelle vie aeree inferiori e determina risposte di emergenza disfunzionali: quello che si ha è un effetto sinergico dato dalla combinazione tra una clearance virale carente e una risposta immunitaria innata eccessiva [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Ad avere un ruolo centrale nella patogenesi del COVID-19, sono le NET. Queste ultime sono strutture tridimensionali simili a reticoli composte da filamenti di cromatina decondensata. I filamenti di cromatina sono costellati di istoni citrullinati, proteine antimicrobiche e citochine, posizionate in maniera tale da poter intrappolare e uccidere gli agenti patogeni quando vengono rilasciati dai neutrofili in fase di apoptosi [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Le NET immobilizzano ed eliminano gli organismi posizionando i virus a diretto contatto con le proteine antivirali. La risposta delle NET è una delle componenti critiche dell'immunità innata, ma può essere disregolata e causare danni alle cellule. Una volta attivate, le NET promuovono un ciclo di feedback positivo che guida l'aggregazione piastrinica e il rilascio di citochine, nonché l'attivazione del complemento [Skendros P et al, J Clin Invest, 2020]. Lo stato pro-infiammatorio in corso di infezione da COVID-19, oltre a stimolare l'attivazione incontrollata del complemento, determina, lo sviluppo di NET, che promuovono la cascata della

coagulazione e inducono uno stato di "trombo-infiammazione" [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

Il plasma, gli aspirati tracheali, il tessuto polmonare e i trombi arteriosi di pazienti affetti da COVID-19 in forma severa contengono tutti un numero maggiore di NET rispetto ai tessuti di pazienti con malattia polmonare non correlata alla SARS-CoV-2. È importante notare che le caratteristiche istologiche delle NET, ossia i neutrofilo associati a microtrombosi (**Figura 3**), sono probabilmente responsabili della polmonite da COVID-19 [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

I pazienti affetti da COVID-19 sono a rischio di lesioni endoteliali sistemiche e trombosi che coinvolgono sia il sistema venoso che quello arterioso [Fenyves BG et al, Am J Hematol, 2021; Fournier M et al, Mayo Clin Proc, 2021].

Il SARS-CoV-2 legandosi alle cellule endoteliali e alle piastrine attraverso i recettori ACE2 e TMPRSS2 induce la disfunzione endoteliale e l'iperattivazione delle piastrine, favorendo così l'attivazione della cascata coagulativa e la formazione di microcoaguli trombotici [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

I pazienti hanno maggiori probabilità di sviluppare lesioni endoteliali polmonari e trombotiche (**Figura 3 B**) e presentano tassi di sanguinamento più elevati con marcatori elevati di lesioni sistemiche come PCR, VES, fibrinogeno e pro-calcitonina. L'attivazione della P-selectina nelle piastrine a riposo, i multimeri del vWF, la riduzione dell'ADAMTS-13 (disintegrin metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 13) e l'aumento della viscosità del sangue supportano il concetto che molti pazienti con COVID-19 soffrono di un'alterata coagulazione. Anche la combinazione di attivazione piastrinica (**Figura 3 C**) e neutrofila promuove la formazione di NET [Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022].

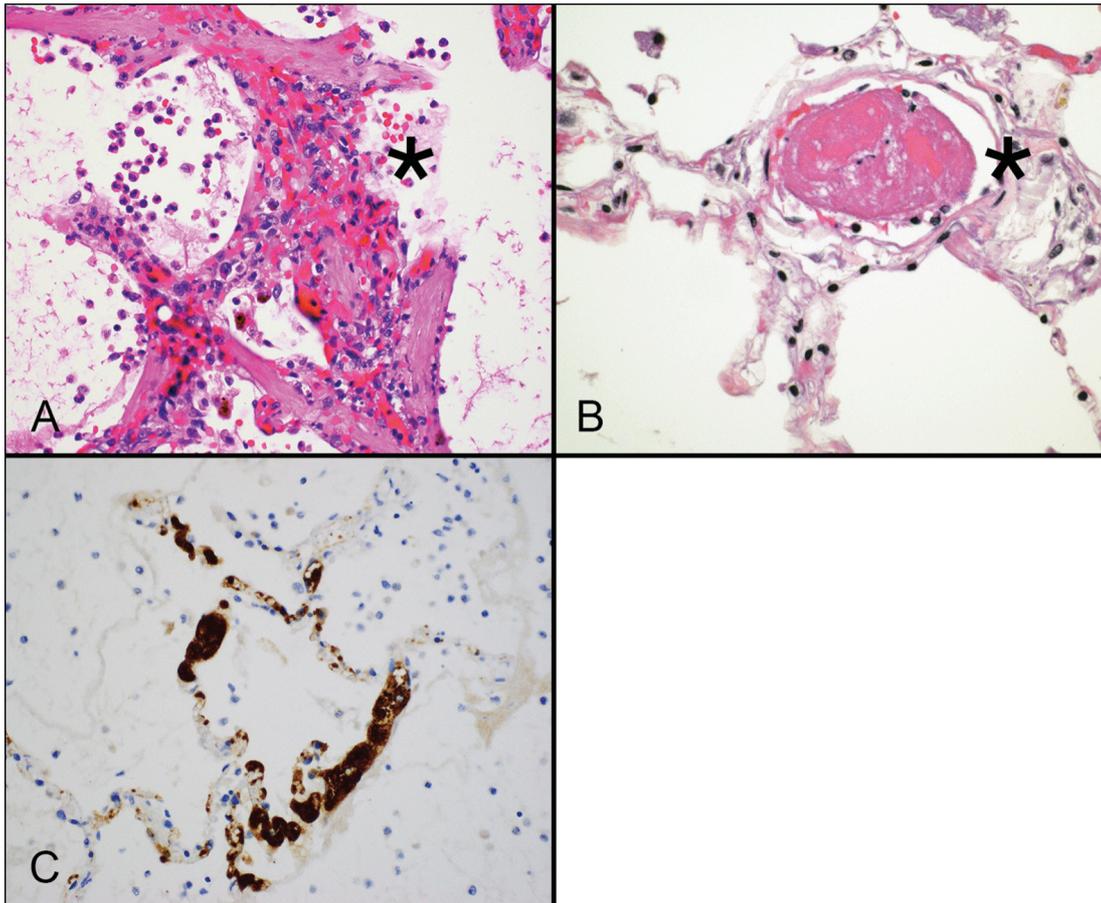


Figura 3: Nella **figura A** è possibile apprezzare, indicata dall'asterisco, la presenza di NET che espandono la parete alveolare, aumentando la resistenza polmonare. I NET appaiono come raccolte di neutrofili, detriti nucleari accompagnati da capillari ingorgati e danneggiati (A).

Nella **figura B**, invece, l'asterisco indica piccoli trombi arteriosi (spesso presenti nei polmoni di pazienti con sintomi polmonari correlati al COVID-19). I letti capillari nelle pareti alveolari mostrano un marcato accumulo di trombi ricchi di piastrine come evidenziato dall'immunoistochimica per CD61 (integrina beta 3; A, B macchie di ematossilina ed eosina).

Immagine tratta da un lavoro di Borczuk AC et al, J Biomed Sci, 2022

1.3 Clinica e trasmissione del virus

Sin dalle prime fasi della pandemia, è stato riconosciuto che il SARS-CoV-2 può manifestarsi come un'infezione asintomatica o come una malattia multisistemica [Iwasaki S et al, J Infect, 2020].

Tra le manifestazioni cliniche del COVID-19 vi sono principalmente i disturbi respiratori, ma, essendo la patologia multisistemica, il quadro sintomatologico può coinvolgere inevitabilmente diversi organi e apparati (**Figura 4**).

Il periodo di incubazione dell'infezione da COVID-19 è di circa 5,2 giorni e i sintomi sono generalmente simili a quelli dei precedenti betacoronavirus, come febbre, tosse e dispnea. Tuttavia, il COVID-19 ha mostrato alcune caratteristiche cliniche uniche, tra cui il coinvolgimento delle vie aeree inferiori, reso evidente da sintomi del tratto respiratorio superiore come rinorrea, starnuti e mal di gola. Inoltre una buona parte di pazienti infetti ha manifestato una sintomatologia intestinale con diarrea [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020].

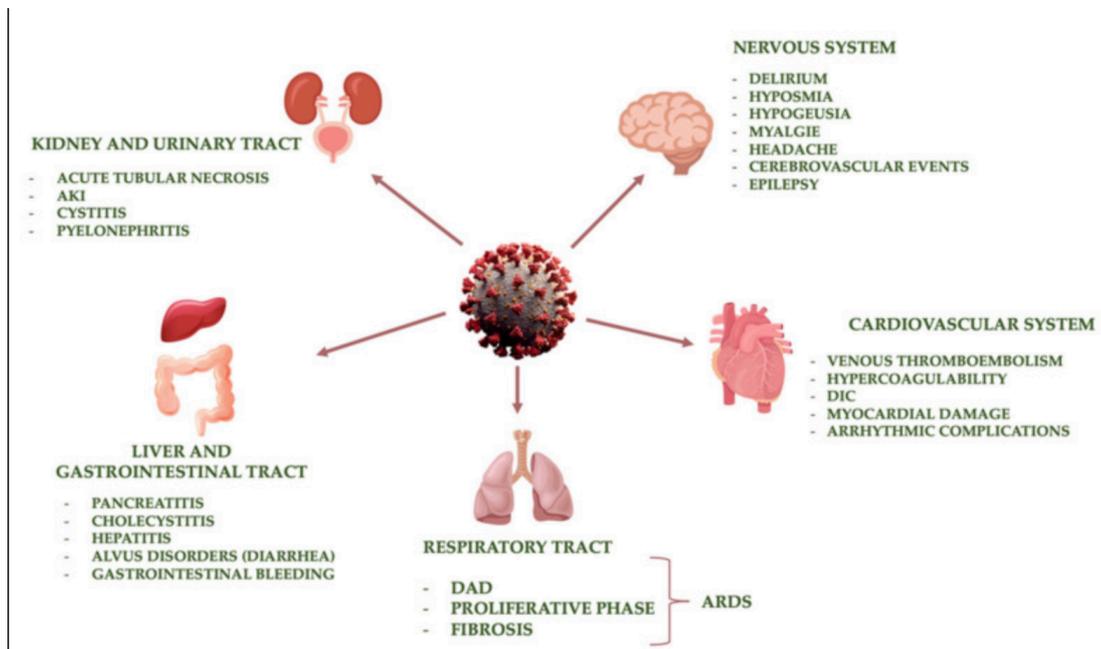


Figura 4: Principali organi bersaglio dell'infezione da SARS-CoV-2. Immagine tratta da un lavoro di Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2021.

All' esordio della malattia, i sintomi più comuni sono febbre, tosse e astenia, mentre altri sintomi includono produzione di espettorato, cefalea, emottisi, diarrea, dispnea e linfopenia [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020].

Come detto in precedenza, il COVID-19 è una una patologia multisistemica, pertanto il un quadro clinico può presentarsi in modo molto variegato e può coinvolgere molteplici organi e apparati.

Oltre alle manifestazioni respiratorie, si annoverano anche quelle otorinolaringoiatriche, cardiovascolari, gastrointestinali, renali, neurologiche, oculari, cutanee, muscoloscheletriche, ematologiche, ed è stato anche dimostrato un coinvolgimento del sistema endocrino e di quello riproduttivo [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Manifestazioni respiratorie

La sintomatologia respiratoria si presenta principalmente sotto forma di tosse secca, astenia, produzione di espettorato, difficoltà respiratorie, mal di gola, congestione nasale ed emottisi [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Come accennato in precedenza, il COVID-19 ha mostrato alcune caratteristiche cliniche uniche, che includono come bersaglio anche le vie aeree inferiori. Inoltre, in base ai risultati della radiografia del torace al momento del ricovero, alcuni casi mostrano un infiltrato nel lobo superiore del polmone, associato a una crescente dispnea con ipossiemia [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020].

Alcuni pazienti possono progredire rapidamente verso il danno polmonare acuto e la Sindrome da Distress Respiratorio Acuto (ARDS) con shock settico. Spesso presentano saturazione di ossigeno nel sangue ridotta ($\leq 93\%$), fino al 50 o 60%. Per gestire questi pazienti si ricorre all'ossigenoterapia, al posizionamento in posizione prona, alla pressione positiva continua delle vie aeree ad alto flusso [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

L'anomalia radiologica più frequente nella tomografia computerizzata (TC) del torace è l'opacità a vetro smerigliato e l'ombreggiatura bilaterale a chiazze [Guan WJ et al, N Engl J Med, 2020]. Tuttavia, i reperti radiologici possono variare nei diversi pazienti e nelle varie fasi della malattia. Altri reperti TC includono l'ispessimento del setto interlobulare, il pattern reticolare. In alcuni studi, sono stati rilevati anche reperti atipici come ispessimento della parete bronchiale, noduli, versamento pleurico e linfadenopatia [Ye Z et al, Eur Radiol, 2020]. In alcuni casi, sono state osservate molteplici opacità periferiche a vetro smerigliato nelle regioni subpleuriche di entrambi i polmoni, che probabilmente hanno indotto una risposta immunitaria sistemica e localizzata che ha portato a un aumento dell'infiammazione. Purtroppo, il

trattamento di alcuni casi con l'inalazione di interferone non ha mostrato alcun effetto clinico e anzi è sembrato peggiorare la condizione con la progressione delle opacità polmonari [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020].

Manifestazioni otorinolaringoiatriche

Le manifestazioni otorinolaringoiatriche (sono coinvolti orecchio, naso e gola) sono tra le più frequenti riscontrate e sono spesso prodromiche.

È patognomonico il deterioramento della sfera sensoriale, in particolare il gusto (disgeusia) e la perdita dell'olfatto (anosmia). Inoltre, tra le disfunzioni otorinolaringoiatriche più comuni si possono annoverare mal di gola, rinorrea, congestione nasale, edema tonsillare e ingrossamento dei linfonodi cervicali [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

L'importante incidenza di edema tonsillare, la congestione della gola e ingrossamento dei linfonodi può essere spiegata dal fatto che vi è un'elevata espressione dei recettori ACE2 sulle cellule epiteliali della mucosa orale e nasale, compresa la lingua. È noto che il nuovo coronavirus ha una forte affinità di legame con i recettori ACE2 attraverso i quali invade le cellule dell'ospite [Xu H et al, Int J Oral Sci, 2020]. Questa teoria può spiegare la comparsa di sintomi extra-respiratori, comprese le manifestazioni otorinolaringoiatriche, come parte dei sintomi del COVID-19 [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Manifestazioni cardiovascolari

Le manifestazioni cardiache nei pazienti con COVID-19 possono verificarsi a causa dello stress cardiaco secondario all'ipossia e all'insufficienza respiratoria, all'effetto diretto del SARS-CoV-2 sul cuore o secondario all'infiammazione e alla tempesta citochinica, agli squilibri metabolici, alla rottura della placca e all'occlusione coronarica da parte del trombo e alle conseguenze dei farmaci utilizzati per il trattamento [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021; Akhmerov A et al, Circ Res, 2020; Bansal M, Diabetes Metab Syndr, 2020].

La necessità di ricovero in terapia intensiva e di ventilazione non invasiva e meccanica invasiva è risultata più elevata tra i pazienti con disturbi cardiaci rispetto a quelli senza coinvolgimento cardiaco, così come la mortalità ospedaliera è risultata più elevata rispetto ai pazienti senza coinvolgimento miocardico [Shi S et al, JAMA Cardiol, 2020]. Questi pazienti tendono a presentare alterazioni elettrocardiografiche e innalzamenti

della troponina cardiaca ad alta sensibilità (hsCTn) e del peptide natriuretico N-terminale di tipo pro-B (NT proBNP), che corrispondono a un aumento dei markers infiammatori [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Sono stati riportati nella sintomatologia ipertensione, miocardite acuta e fulminante, aritmie ventricolari, fibrillazione atriale, cardiomiopatia da stress, ipotensione e insufficienza cardiaca, sindrome coronarica acuta (ACS) con sopraslivellamento ST [Akhmerov A et al, Circ Res, 2020; Kochi AN et al, J Cardiovasc Electrophysiol, 2020].

I pazienti che si sono ripresi dalla malattia acuta possono sviluppare aritmie come risultato della cicatrice miocardica e necessitano di un monitoraggio futuro [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Manifestazioni neurologiche

Le manifestazioni neurologiche sono molto comuni e la maggior parte dei pazienti affetti da COVID-19 sviluppa sintomi neurologici insieme a sintomi respiratori durante il decorso della malattia; tuttavia, è stata documentata anche la sola presenza di disfunzioni neurologiche senza i tipici sintomi di febbre, tosse e difficoltà respiratorie [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021; Sheraton M et al, Cureus, 2020].

Il SARS-CoV-2, infatti, media la neuroinfiammazione e induce la fibrosi nel sistema nervoso centrale (SNC) [Zhou Z et al, J Neurol, 2020].

A livello del SNC, assistiamo all'invasione diretta di neuroni e cellule gliali da parte del SARS-CoV-2 e alla disfunzione endoteliale della barriera ematoencefalica (BEE). Il virus può accedere al sistema nervoso centrale tramite diffusione ematogena o movimento retrogrado attraverso il bulbo olfattivo e può essere rilevato nel liquor mediante test molecolare RT-PCR (Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) e sul parenchima cerebrale durante l'autopsia. Il fatto che la maggior parte dei pazienti sviluppi anosmia o iposmia durante la malattia supporta questa teoria [Ghannam M et al, J Neurol, 2020]. La BEE è costituita da giunzioni strette tra le cellule epiteliali del plesso coroideo, l'epitelio cerebrale e quello aracnoideo [Abbott NJ et al, Neurobiol Dis, 2010]. Sono state avanzate alcune ipotesi circa l'ingresso del SARS-CoV-2 nel SNC:

Il virus può perturbare la BEE a causa dell'infiammazione sistemica che si verifica in risposta all'infezione virale nei polmoni [Abbott NJ et al, Neurobiol Dis, 2010]. L'infezione da SARS-CoV-2 del tratto respiratorio provoca il rilascio di citochine pro-

infiammatorie (IL-1 β , IL6 e TNF α) nel siero. Le citochine, come l'IL-1 β , possono legarsi ai recettori IL-1R1 (recettori dell'interleuchina 1 di tipo 1) espressi dalle cellule endoteliali microvascolari cerebrali (BMEC) e promuovere la perdita delle proteine della giunzione serrata [Daniels BP et al, mBio, 2014]. Ciò potrebbe causare l'ingresso del SARS-CoV-2 nel SNC, con conseguente neuroinfiammazione (**Figura 5**) [Zhou Z et al, J Neurol, 2020].

Il virus entra nel SNC attraverso il legame con il recettore ACE2 delle cellule endoteliali della BEE [Zhou Z et al, J Neurol, 2020] ; alcuni pazienti COVID-19 sviluppano viremia e la proteina S1 del SARS-CoV-2 nel siero può legarsi all'ACE2 espresso dalle cellule endoteliali microvascolari cerebrali ed entrare nel parenchima cerebrale [Rhea EM et al, Nat Neurosci, 2021]. Il legame di S1 sulle cellule endoteliali microvascolari cerebrali, in combinazione con la segnalazione indotta da IL-1R1, potrebbe promuovere la rottura della BEE [Vanderheiden A et al, Curr Opin Neurobiol, 2022]. L'interazione del virus con i recettori ACE2 dei neuroni può causare, di conseguenza, danni assonali e quindi accelerare una serie di malattie neurodegenerative (**Figura 5**) [Wang F et al, Med Sci Monit, 2020].

Il virus può aggirare la protezione della BEE infettando macrofagi e monociti che si infiltrano nel SNC e promuovono il danno neuronale [Zhou Z et al, J Neurol, 2020].

Dopo l'ingresso nella BEE, il virus può causare una gliosi reattiva con attivazione della cascata infiammatoria. In seguito all'infezione da SARS-CoV-2, i pazienti possono presentare un forte aumento delle citochine pro-infiammatorie sistemiche, come discusso in precedenza. Poiché le cellule della microglia si attivano in seguito a lesioni o infezioni del SNC [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021], l'infezione da SARS-CoV-2 potrebbe suscitare un fenotipo pro-infiammatorio della microglia, che può presentarsi nel paziente come un disturbo neurodegenerativo. La rottura della BEE comporta, infatti, il rilascio di proteine molecolari associate al pericolo, come l'ATP (adenosina trifosfato), che possono legarsi a recettori, come P2RY12, sulla microglia e promuoverne l'attivazione. S1 che attraversa la barriera può legarsi al TLR4 (toll-like receptor 4) e promuovere l'attivazione microgliale [Vanderheiden A et al, Curr Opin Neurobiol, 2022]. La presenza di microglia pro-infiammatoria reattiva può anche

aumentare l'espressione di geni che causano neuroinfiammazione (**Figura 5**) [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021].

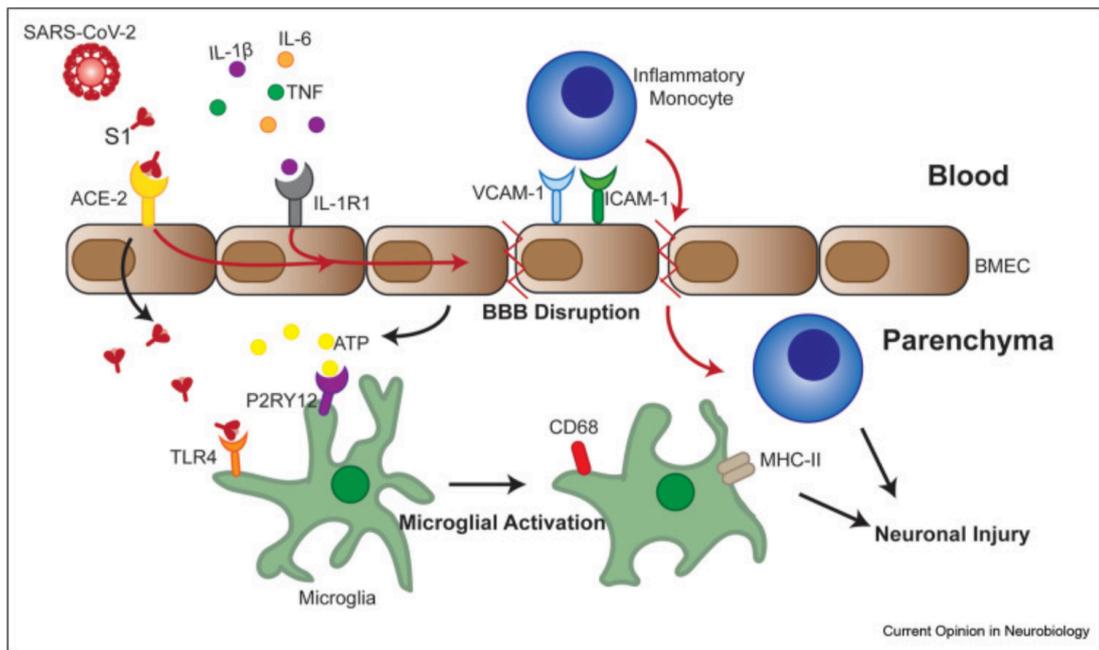


Figura 5: Meccanismi di neuroinfiammazione durante l' infezione da SARS-CoV-2 . Immagine tratta da un lavoro di Vanderheiden A et al, Curr Opin Neurobiol, 2022.

In sintesi, l'infezione da SARS-CoV-2 può facilitare le lesioni neuronali e le alterazioni neurologiche. Con l'infezione possono verificarsi encefalite e disordini della coagulazione con formazione di microtrombi potenzialmente fatali. Inoltre la sindrome infiammatoria multisistemica dei pazienti gravemente colpiti può portare a fibrosi e trombosi, con conseguenze sul cervello [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021]. La combinazione di infiammazione sistemica, tempesta citochinica e disfunzione della coagulazione può compromettere la funzione della BEE e alterare l'equilibrio cerebrale, causando la morte neuronale [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

I sintomi neurologici tendono a manifestarsi precocemente nel corso della malattia e possono essere considerati come caratteristiche peculiari del quadro clinico, oltre ad essere annoverati tra le principali sequele dell'infezione riscontrate nella sindrome Long-COVID.

Le manifestazioni neurologiche più comuni includono:

Cefalea: l'ipossia, le anomalie metaboliche e l'infiammazione sistemica possono contribuire allo sviluppo di cefalea. Il disturbo è stato evidenziato nel 40% dei pazienti con COVID-19, pertanto, il riscontro di cefalee di nuova insorgenza e qualsiasi cambiamento nel carattere delle cefalee in un paziente con disturbo primario noto ci suggerisce la possibilità di rintracciare come possibile fattore scatenante l'infezione da SARS-CoV-2. [Ding Q et al, J Med Virol, 2020]. Inoltre, la cefalea può insorgere anche come complicanza di altre patologie neurologiche connesse al COVID-19, tra cui meningite, encefalite, vasculite e ipertensione intracranica [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021].

Anosmia, ageusia: uno studio ha riportato che l'88,5% dei pazienti con COVID-19 presenta disfunzioni olfattive e l'88% disfunzioni del gusto [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021].

Disturbi cognitivi e demenza: studi riportano che pazienti affetti da demenza hanno maggiore probabilità di contrarre il COVID-19 e pertanto sono esposti a un rischio maggiore di deterioramento cognitivo; in molti pazienti è stato riscontrato un declino della memoria e delle capacità di orientamento, oltre alla riduzione dei livelli di indipendenza e declino funzionale. Altri pazienti hanno manifestato disturbi comportamentali nuovi o in peggioramento, tra cui aggressività, apatia e depressione. Pertanto, si è giunti alla conclusione che il COVID-19 influisca indirettamente sulle condizioni cliniche dei pazienti con demenza e altri disturbi cognitivi [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021].

Encefalopatia: l'encefalopatia è caratterizzata da un'alterazione dello stato mentale. Tra i sintomi rientrano la perdita di memoria, i cambiamenti di personalità e la depressione.

Le cause sono spesso di carattere tossico-metabolico, ipossia, insufficienza d'organo ed effetti avversi dei farmaci. I fattori di rischio che predispongono un paziente all'insorgenza dei sintomi, includono una malattia neurodegenerativa sottostante, come l'Alzheimer, l'età avanzata, un'infezione, anomalie metaboliche ed endocrine, una malattia sistemica o altre patologie causa di deterioramento cognitivo [Ahmed S et al, Age Ageing, 2014].

Sulla base di segnalazioni di casi di encefalopatia correlati a COVID-19 e a studi recenti, è risultato che l'encefalopatia sia più comune nei pazienti affetti da COVID-19 adulti rispetto a quelli pediatrici. I pazienti presentano principalmente uno stato di confusione generalizzata, agitazione, incoscienza, alterazione dello stato mentale e convulsioni [Liotta EM et al, Ann Clin Transl Neurol, 2020]. All'elettroencefalogramma, l'anomalia di fondo è risultata essere un rallentamento diffuso dell'attività elettrica cerebrale, mentre alla risonanza magnetica è stato riscontrato che la sede più comunemente interessata dal danno fosse la regione frontale [Antony AR et al, Seizure, 2020].

Atassia: lo sviluppo di atassia secondaria a COVID-19 è poco comune, con solo lo 0,4% di pazienti affetti. Alcuni di questi hanno riportato lo sviluppo di atassia prima, durante e dopo COVID-19 [Liotta EM et al, Ann Clin Transl Neurol, 2020].

Sindrome di Guillain-Barré (GBS): esiste un'associazione tra COVID-19 e Sindrome di Guillain-Barré; le principali manifestazioni cliniche riscontrate comprendono debolezza generalizzata, riduzione dei riflessi, paresi/paralisi facciale e ipoestesi [Pimentel V et al, Brain Behav Immun Health, 2023], parestesie agli arti inferiori, con esordio dei sintomi neurologici 5-10 giorni dopo la comparsa dei sintomi virali [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021].

La polineuropatia demielinizzante infiammatoria acuta è apparsa come il sottotipo più comune di GBS riscontrato nei pazienti. Sono state segnalate, in misura minore, la neuropatia assonale motoria acuta, la neuropatia assonale sensomotoria acuta, la variante faringeo-cervico-brachiale, la sindrome di Miller-Fisher e la polineurite craniale, nonché debolezza faringea e facciale [Pimentel V et al, Brain Behav Immun Health, 2023].

Paralisi di Bell: la paralisi di Bell correlata a COVID-19 è risultata essere poco comune tra i pazienti che presentavano sintomi otorinolaringoiatrici. Tra i sintomi sono state segnalate debolezza bilaterale e paralisi facciale, manifestate in corso d'infezione [Elibol E., Eur Arch Otorhinolaryngol, 2021].

Manifestazioni neuropsichiatriche: le complicanze neuropsichiatriche, in particolare la depressione, l'ansia, la psicosi, il disturbo post traumatico da stress legati

al COVID-19 sembrano essere estremamente comuni e comprendono un ampio spettro di fenotipi disfunzionali che hanno un impatto negativo sulla qualità della vita. La pandemia ha scatenato una crisi di salute mentale tra la popolazione globale. Numerosi studi hanno descritto un'alta prevalenza di sintomi ansiosi e depressivi [Torales J et al, Int J Soc Psychiatry, 2020].

L'infiammazione eccessiva e la "tempesta citochinica" in risposta al virus potrebbero essere i meccanismi alla base anche delle complicazioni neuropsichiatriche [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021]. Le citochine IL-1 β IL6 e TNF α , sono state associate alla depressione maggiore e ai disturbi d'ansia [Dowlati Y et al, Biol Psychiatry, 2010].

Crisi epilettiche: sebbene siano stati riportati casi di pazienti affetti da COVID-19 che hanno avuto crisi epilettiche senza storia di epilessia, non è chiaro se ciò sia stato dovuto direttamente all'infezione da SARS-CoV-2 o se si tratti di un disturbo convulsivo silente riattivatosi a causa del virus, poiché i pazienti con disturbi convulsivi sottostanti sono risultati essere a maggior rischio di crisi epilettiche dovute a infezioni, compresa quella da COVID-19 [Li Y et al, Intervirology, 2016].

Ictus: l'ictus sta emergendo come una complicanza comune e potenzialmente letale in seguito all'infezione da SARS-CoV-2, nonostante la profilassi per il tromboembolismo venoso [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Tra i pazienti affetti da COVID-19 più colpiti vi sono gli anziani, gli ipertesi, o i pazienti con livelli più elevati di D-dimero e PCR e con un decorso clinico più grave dell'infezione [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021].

I meccanismi fisiopatologici attraverso cui il SARS-CoV-2 può causare ictus ischemico sono stati illustrati in precedenza e includono la coagulopatia e il danno miocardico con embolia cerebrale. Gioca un ruolo importante la "tempesta citochinica" innescata in risposta al virus che può causare un aumento del D-dimero e alterare la coagulazione, portando a ictus. L'infiammazione può, inoltre, destabilizzare la capsula fibrosa intorno alla placca ateromasica, che potrebbe esporre il materiale trombogenico, provocando così l'ostruzione delle arterie, che a sua volta causerebbe ictus. Il virus può anche danneggiare il cuore, causando una miocardite virale, con conseguente ictus cardioembolico.

L'ictus emorragico può essere causato anch'esso dalla tempesta citochinica o dal legame del SARS-CoV-2 con i recettori ACE2 delle cellule endoteliali e della muscolatura liscia arteriosa cerebrale, che danneggia le arterie intracraniche fino a provocarne la rottura [Amruta N et al, Cytokine Growth Factor Rev, 2021].

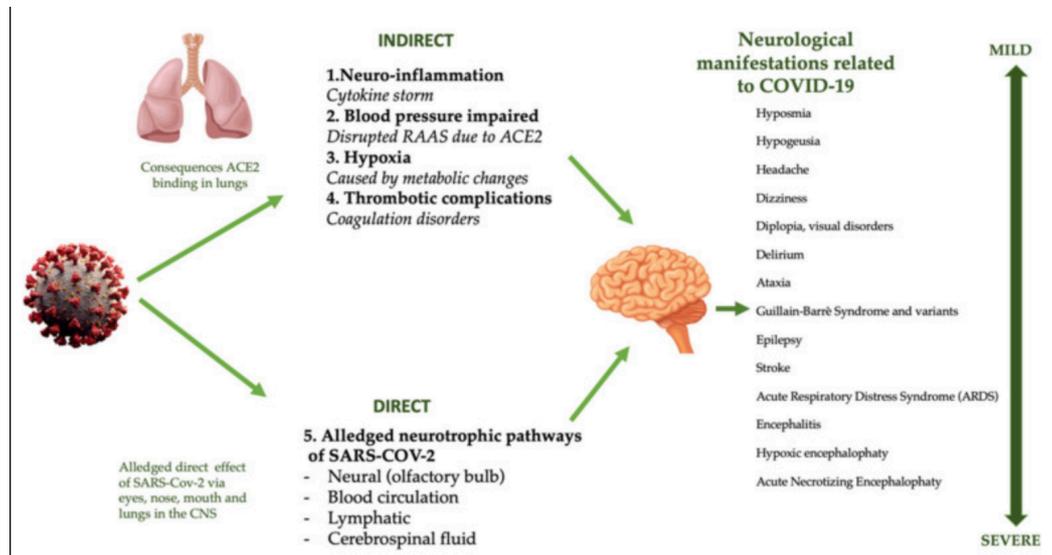


Figura 6: Meccanismi diretti e indiretti di danno al SNC da COVID-19 e relative manifestazioni cliniche. Immagine tratta da un lavoro di Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2021.

Manifestazioni gastrointestinali

A differenza dei pazienti affetti da MERS-CoV o SARS-CoV, i pazienti con COVID-19 hanno sviluppato sintomi gastrointestinali come nausea, vomito o diarrea [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020].

È stato dimostrato che l'anoressia è il sintomo gastrointestinale più frequente negli adulti. La diarrea è molto comune sia negli adulti che nei bambini, mentre il vomito è risultato essere più comune in età pediatrica [Tian Y et al, Aliment Pharmacol Ther, 2020]. Altri sintomi rari riscontrati sono stati la nausea, il dolore addominale e il sanguinamento gastrointestinale [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Soltanto in pochi casi, pazienti affetti da COVID-19 hanno presentato solo sintomi gastrointestinali senza sviluppare febbre o sintomi respiratori all'esordio e durante la progressione della malattia. Inoltre, i pazienti con sintomi gastrointestinali tendono ad avere un intervallo più lungo tra l'insorgenza dei sintomi e il ricovero in ospedale, probabilmente a causa della mancanza di sospetto clinico e del ritardo nella diagnosi. I pazienti con sintomi gastrointestinali tendono ad avere un innalzamento maggiore di

AST (aspartato aminotransferasi) e ALT (alanina aminotransferasi), indici di danno epatico coesistente [Pan L et al, Am J Gastroenterol, 2020]. La disfunzione epatica è probabilmente secondaria all'uso di farmaci epatotossici, al danno epatico indotto dall'ipossia, all'infiammazione sistemica e all'insufficienza multiorgano [Feng G et al, J Clin Transl Hepatol, 2020].

Il meccanismo alla base della malattia gastrointestinale non è chiaramente noto, ma potrebbe essere dovuto all'invasione diretta del virus attraverso il recettore ACE2 nella mucosa intestinale. Ciò può essere supportato dal fatto che l'RNA virale può essere rilevato in campioni di feci di pazienti affetti da COVID-19, il che potrebbe anche suggerire una possibile trasmissione fecale-orale [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Pertanto, è importante analizzare i campioni di feci e urine per escludere una potenziale via di trasmissione alternativa del virus [Rothan HA et al, J Autoimmun, 2020].

Manifestazioni renali

Tra gli organi bersaglio della SARS-CoV-2, può essere coinvolto anche il sistema urinario. Le manifestazioni renali nei pazienti con COVID-19 possono verificarsi a causa dell'invasione diretta dei podociti e delle cellule tubulari prossimali da parte del virus SARS-CoV-2, della disfunzione endoteliale secondaria e della disfunzione tubulare prossimale acuta [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021; Su H et al, Kidney Int, 2020]. Inoltre, l'ipossia, la tempesta citochinica, la rhabdmiolisi, i farmaci nefrotossici e le infezioni sottostanti possono esacerbare il danno renale [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

La presenza di danno renale acuto (AKI) tra i pazienti ricoverati in COVID-19 è risultata essere molto comune. Al momento del ricovero, molti pazienti presentavano proteinuria, ematuria, creatinina elevata, azoto ureico elevato e bassa velocità di filtrazione glomerulare ($GFR \leq 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$).

Alcuni pazienti hanno sviluppato l'AKI durante la malattia. L'AKI era più diffusa tra i soggetti già affetti da insufficienza renale [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021; Cheng Y et al, Kidney Int, 2020]. Dai rapporti autoptici eseguiti nella città di Wuhan, l'esame microscopico del rene ha rivelato che l'AKI era indotta da necrosi tubulare acuta, caratterizzata da dilatazione del lume, degenerazione vascolare e alterazione dell'epitelio tubulare [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2021].

I principali meccanismi fisiopatologici ipotizzati essere alla base dell'insorgenza di AKI includono:

Induzione diretta da parte del virus di alterazioni istopatologiche nel rene. Dallo studio di reperti autoptici è stata, infatti, dimostrata la presenza di particelle virali a livello dell'epitelio tubulare e dei podociti, rilevate al microscopio elettronico. Diversi studi hanno dimostrato che il virus entra nel parenchima renale attraverso il legame con i recettori ACE2, TMPRSS2 e catepsina-1, altamente espressi a livello renale.

Disfunzione endoteliale indotta dal virus, interconnessa con la coagulopatia, tipica dei pazienti con COVID-19.

La “tempesta citochinica” in risposta al virus durante la fase acuta dell’infiammazione, che spiega il coinvolgimento renale [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2021].

Inoltre, il rene può essere coinvolto anche indirettamente: se i pazienti presentano sintomi gastrointestinali (come diarrea e, più raramente, vomito) e febbre, questi potrebbero indurre una riduzione della volemia, e quindi rendere i pazienti maggiormente predisposti a sviluppare l'AKI. Anche i farmaci utilizzati nei pazienti in condizioni critiche possono essere nefrotossici: gli antibiotici possono indurre un danno tubulare o una nefrite interstiziale acuta. Talvolta, i pazienti COVID-19 più critici possono avere infezioni secondarie concomitanti (ad esempio, batteriche o fungine) che aumentano il rischio di AKI secondaria allo stato settico. Infine, non va trascurato il fatto che l'età del paziente e le comorbidità di base giocano un ruolo fondamentale nell'insorgenza dell'AKI [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2021].

Le alterazioni strutturali indotte dal virus possono provocare un danno renale permanente con conseguente malattia renale cronica. I pazienti che sviluppano un'insufficienza renale sono soggetti a una maggiore mortalità in ospedale [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Un altro punto da sottolineare è la presenza del COVID-19 nei pazienti portatori di trapianto renale [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021]. A causa dell'immunosoppressione, è probabile che questi pazienti abbiano una febbre bassa all’esordio dei sintomi, con un rapido declino clinico e la necessità di ventilazione meccanica con un'elevata mortalità rispetto alla popolazione generale [Akalin E et al, N Engl J Med, 2020].

Manifestazioni oculari

La congiuntivite e la lacrimazione sono solitamente annoverate tra i sintomi prodromici dell'infezione [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Le manifestazioni oculari possono variare da un'iniezione congiuntivale a una franca congiuntivite. Comuni tra i pazienti con COVID-19 grave sono l'iperemia congiuntivale, la sensazione di corpo estraneo nell'occhio, la chemiosi, la lacrimazione o l'epifora [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

La presenza del SARS-CoV-2 può essere dimostrata nel tampone congiuntivale e nasofaringeo, indicando una potenziale via di trasmissione virale [Dockery DM et al, J Emerg Med, 2020].

Manifestazioni cutanee

Come altre infezioni virali, anche il SARS-CoV-2 può avere manifestazioni dermatologiche. La patogenesi, per quanto concerne l'interessamento cutaneo, rimane comunque poco chiara e alcuni aspetti potrebbero essere spiegati dalla vasculite dei piccoli vasi, eventi trombotici come CID (coagulazione intravascolare disseminata), formazione di trombi ialini, ischemia acrale o effetto diretto del virus come in altre malattie virali [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

L'esantema maculopapulare (36,1%) è stato identificato come la caratteristica dermatologica più comune, seguito da rash papulovesicolare (34,7%), papule dolorose acrali rosso porpora (15,3%), orticaria (9,7%), livido reticularis (2,8%) e petecchie (1,4%) [Sachdeva M et al, J Dermatol Sci, 2020].

Esistono casi di COVID-19 associati a eritema multiforme e malattia di Kawasaki nei bambini [Jones VG et al, Hosp Pediatr, 2020; Labé P et al, J Eur Acad Dermatol Venereol, 2020].

Manifestazioni muscoloscheletriche

Tra le manifestazioni muscoloscheletriche più comuni si riscontrano mialgie e artralgie. Alcuni rapporti suggeriscono che, durante la malattia da COVID-19, possono verificarsi miosite e rabdomiolisi con un marcato innalzamento della creatininchinasi, soprattutto nei pazienti con malattie gravi e insufficienza multiorgano [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021]. Inoltre, in alcuni pazienti, la rabdomiolisi è stata documentata come presentazione iniziale della malattia da COVID-19 senza sintomi respiratori tipici [Suwanwongse K et al, Cureus, 2020; Chan KH et al, Am J Emerg Med, 2020].

Manifestazioni ematologiche

L'infiammazione sistemica indotta dalla malattia e la tempesta citochinica possono avere un impatto significativo sul processo di emopoiesi ed emostasi [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Durante le prime fasi della malattia, è stata documentata una conta leucocitaria e linfocitaria normale o ridotta, con una marcata linfopenia con il progredire della malattia, soprattutto nei soggetti con tempesta citochinica in atto e malattia grave [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021].

Di comune riscontro nei pazienti gravi sono la linfopenia, la trombocitopenia e la leucopenia.

La leucocitosi nei pazienti affetti da COVID-19 potrebbe suggerire un'infezione batterica o una superinfezione ed è stata riscontrata più comunemente nei casi gravi.

La linfopenia è stata anche associata a una maggiore necessità di ricovero in terapia intensiva e al rischio di ARDS.

La trombocitosi con un elevato rapporto piastrine/linfociti può indicare una tempesta di citochine più marcata [Qu R et al, J Med Virol, 2020]. Inoltre, le anomalie della coagulazione possono manifestarsi sotto forma di trombocitopenia, prolungamento del tempo di protrombina (PT), basso livello di fibrinogeno sierico e aumento del D-dimero, suggerendo una CID. Anche l'aumento della lattato deidrogenasi (LDH) e della ferritina sierica correlano con il grado di infiammazione sistemica. Inoltre, la PCR è risultata aumentata nel 75-93% dei pazienti, più comunemente in pazienti con malattia grave. L'aumento dei livelli di procalcitonina sierica può suggerire un peggioramento della prognosi. La malattia grave è legata a un aumento delle ALT, della bilirubina, dell'urea sierica, della creatinina e a una riduzione dell'albumina sierica [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021; Lippi G et al, Clin Chem Lab Med, 2020].

Uno studio su 1.426 pazienti ha dimostrato che l'IL6 è aumentata maggiormente nei pazienti con COVID-19 grave rispetto a quelli con COVID-19 non grave, con un aumento progressivo che indica un aumento del rischio di mortalità. Pertanto, i suoi livelli potrebbero essere considerati un importante indicatore prognostico per l'infiammazione estesa e la tempesta citochinica nei pazienti con COVID-19. Anche altre citochine e chemochine plasmatiche come IL1 β , IFN γ , IP10 sono risultate elevate nei pazienti con COVID-19, sia nelle patologie gravi che in quelle non gravi. Inoltre, GCSF, IP10, IL2, IL7, IL10, MCP1, MIP1 α e TNF α sono aumentati nei

pazienti che richiedono il ricovero in terapia intensiva, il che indica che la tempesta di citochine è associata a un quadro severo di malattia [Huang C et al, Lancet, 2020].

Coinvolgimento del sistema endocrino

Per quanto concerne le patologie endocrinologiche, è acclarato che il diabete mellito sia un importante fattore di rischio per l'insorgenza del COVID-19. Inoltre, sono stati riportati casi di tiroidite subacuta legati all'infezione da SARS-CoV-2 [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021; Brancatella A et al, J Clin Endocrinol Metab, 2020; Asfuroglu Kalkan E et al, J Endocrinol Invest, 2020].

In base alla dichiarazione rilasciata dalla Società Europea di Endocrinologia, i pazienti con insufficienza surrenalica primaria e iperplasia surrenalica congenita potrebbero avere teoricamente una maggiore suscettibilità all'infezione con un rischio più elevato di complicanze e, in ultima analisi, di mortalità, ma non ci sono prove attuali a sostegno di questo [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021; Puig-Domingo M et al, Endocrine, 2020].

Coinvolgimento del sistema riproduttivo

Si è ipotizzato che COVID-19 possa causare un potenziale danno testicolare sia legandosi direttamente ai recettori testicolari ACE2, che sono altamente espressi nei testicoli, sia danneggiando indirettamente il testicolo attraverso l'eccitazione del sistema immunitario locale [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021; Illiano E et al, Andrologia, 2020].

Uno studio ha evidenziato in pazienti maschi affetti da COVID-19 la presenza di bassi livelli di testosterone, alti livelli di ormone luteinizzante (LH), bassi rapporti testosterone/LH, basso rapporto ormone follicolo stimolante (FSH)/LH e aumento della prolattina sierica. Ciò può suggerire un potenziale danno testicolare da COVID-19 che colpisce le cellule di Leydig nel testicolo. I pazienti di sesso maschile infettati da COVID-19 possono presentare una riduzione del numero di spermatozoi e della motilità, con conseguente diminuzione della fertilità maschile nei 3 mesi successivi all'infezione [Mehta OP et al, Front Public Health., 2021; Segars J et al, Fertil Steril, 2020].

Trasmissione del virus

Per quanto concerne le modalità di trasmissione del virus, una delle principali modalità di trasmissione del SARS-CoV-2 è la trasmissione da uomo a uomo, come per il SARS-CoV e il MERS-CoV. Le vie di trasmissione principali per il COVID-19 sono

la trasmissione aerea tramite goccioline respiratorie emesse, ad esempio, durante uno starnuto o un colpo di tosse (“droplets”) e il contatto [Bulut C et al, Turk J Med Sci, 2020].

Tuttavia, per avere un quadro più preciso e controllare al meglio l’evoluzione della malattia, è necessario indagare tutte le possibili vie di trasmissione [Bulut C et al, Turk J Med Sci, 2020].

Per quanto riguarda la **trasmissione fecale**, la presenza di pazienti con diarrea, il ritrovamento di campioni fecali positivi al SARS-CoV mediante RT-PCR (come detto in precedenza), e il rilevamento di virus vivo nelle feci suggeriscono che le feci siano infettive [Bulut C et al, Turk J Med Sci, 2020]. La possibilità di una trasmissione fecale rimane aperta fino a quando non verrà rilevato un virus vitale nei campioni di feci e non saranno disponibili nuovi dati che dimostrino la trasmissione orale-fecale [Wölfel R et al, Nature, 2020].

La **trasmissione intrauterina o transplacentare** da donne gravide infette ai loro feti è un altro punto importante per la trasmissione. Secondo uno studio sull'analisi di 38 donne gravide affette da COVID-19, non vi erano segni di trasmissione intrauterina del SARS-CoV-2 dalle madri ai loro feti [Bulut C et al, Turk J Med Sci, 2020]. Gli studi hanno anche sottolineato che il decorso del COVID-19 era normale nelle donne in gravidanza rispetto a quello della SARS e della MERS [Schwartz DA, Arch Pathol Lab Med, 2020; Rasmussen SA et al, Am J Obstet Gynecol, 2020].

Un altro studio ha anche esaminato che non abbiamo prove definitive di trasmissione verticale [Dashraath P et al, Am J Obstet Gynecol, 2020].

Le persone infettate dal SARS-CoV-2 possono essere contagiose prima della comparsa dei sintomi. La trasmissione presintomatica rende più difficoltoso arginare la diffusione del virus, pertanto i portatori asintomatici sono un importante gruppo target da prendere in considerazione per il controllo della malattia [Bulut C et al, Turk J Med Sci, 2020].

1.4 Diagnostica

Metodiche di rilevazione del virus SARS-CoV-2

I metodi di rilevazione del SARS-CoV-2 consentono di porre diagnosi di COVID-19 e appare evidente come una diagnosi repentina attraverso un test che sia il più accurato, sensibile e specifico possibile possa avere un impatto decisivo sull'evoluzione e il contenimento del contagio. Parametri essenziali per garantire l'efficacia dei test sono i tempi, quindi la velocità di esecuzione, e i costi.

L'individuazione del virus è altrettanto importante per delineare un'analisi realistica della situazione epidemiologica a livello nazionale e globale.

Le metodiche per la rilevazione del SARS-CoV-2 sono in grado di identificare:

1. Specifiche regioni del gene virale attraverso tecniche di amplificazione degli acidi nucleici nella reazione a catena della polimerasi in tempo reale: **RT-PCR**, che identifica la presenza dell'RNA del SARS-CoV-2 in campioni biologici ed è considerata il test diagnostico gold standard per il rilevamento di SARS-CoV-2 grazie alla sua capacità di misurare direttamente le parti genomiche virali piuttosto che i biomarcatori secondari come antigeni o anticorpi [Yüce M et al, Biosens Bioelectron, 2021; Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

La RT-PCR è, quindi, una versione del metodo PCR sviluppata per il rilevamento dei geni virali e in particolare dell'RNA genomico. La tecnica si basa su due reazioni consecutive:

- a) conversione dell'RNA in DNA complementare (cDNA) attraverso l'enzima di trascrizione inversa (trascrittasi inversa);
- b) amplificazione del campione di cDNA mediante reazione a catena della polimerasi utilizzando primer specifici per il gene e sonde di idrolisi marcate in fluorescenza.

La prima fase produce modelli di DNA da utilizzare nella seconda fase, in cui il numero di copie del DNA viene aumentato attraverso ripetuti cicli termici. I primer gene-specifici guidano la seconda reazione per l'amplificazione solo della regione selezionata del genoma, mentre le sonde producono segnali fluorescenti ad ogni amplificazione riuscita delle regioni geniche, consentendo

un sistema di reazione quantificabile [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

I campioni biologici utilizzati possono provenire da vari distretti dell'organismo, tra cui tamponi nasofaringei, orofaringei o nasali, aspirati delle vie respiratorie superiori e inferiori, lavaggi broncoalveolari ed espettorato. In generale, i campioni del tratto respiratorio inferiore forniscono una attendibilità diagnostica più elevata rispetto a quelli del tratto respiratorio superiore che potrebbero causare risultati inaccurati poiché il virus inizia a spostarsi verso le parti inferiori dell'apparato respiratorio dopo la prima settimana di infezione, ma la loro raccolta è più invasiva e aumenta anche il rischio di trasmissione agli operatori sanitari [Yüce M et al, Biosens Bioelectron, 2021; Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

I campioni biologici principalmente utilizzati per la diagnosi di COVID- 19 sono ottenuti da:

Tamponi orofaringei/nasofaringei: sono i campioni più frequentemente in uso [Wyllie AL et al, N Engl J Med, 2020]. Devono essere ottenuti da personale addestrato, seguendo una metodologia protocollata che comprende la disponibilità del materiale necessario, la corretta etichettatura delle provette e l'uso appropriato dei dispositivi di protezione individuale (DPI), le istruzioni al paziente, la procedura per ottenere il campione e la sua corretta manipolazione e trasferimento in laboratorio [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

Espettorato: i campioni di espettorato sono difficili da ottenere perché pochi pazienti con COVID-19 producono espettorato spontaneo [Huang C et al, Lancet, 2020] e l'espettorato indotto non è indicato a causa del rischio di diffusione virale. Tuttavia, è stato osservato che la carica virale è generalmente più elevata nei campioni di espettorato rispetto a quelli ottenuti con tamponi nasofaringei e orofaringei [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021; Pan Y et al, Lancet Infect Dis, 2020].

Campioni salivari: le ghiandole salivari esprimono ACE2, che facilita l'ingresso del virus nelle cellule [Hoffmann M et al, Cell, 2020]. Il prelievo di

campioni di saliva per la diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 presenta alcuni vantaggi, come la facilità di prelievo non invasivo, il minor rischio di infezione per gli operatori sanitari, la possibilità di autocampionamento e il minor rischio di emorragia per i pazienti con disturbi della coagulazione. Tuttavia, la sensibilità PCR dei campioni di saliva è inferiore a quella ottenuta nei campioni nasofaringei. Inoltre, nella fase di convalescenza la carica virale diminuisce prima nei campioni di saliva rispetto a quelli nasofaringei, in cui il virus morto potrebbe persistere e portare a un "falso positivo" [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021; Iwasaki S et al, J Infect, 2020].

La saliva svolge un ruolo importante nella trasmissione del COVID-19 nella popolazione, quindi i campioni salivari potrebbero essere un'alternativa per monitorare il carico epidemiologico della SARS-CoV-2 nella popolazione generale [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

Aspirato tracheobronchiale: questo tipo di campionamento è possibile solo nei pazienti sottoposti a ventilazione meccanica o tracheostomia. Sebbene la carica virale rilevata sia elevata, questa procedura può comportare un rischio significativo per l'operatore sanitario che la esegue [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021; Zuo MZ et al, Chin Med Sci J, 2020].

Lavaggio broncoalveolare (BAL): il SARS-CoV-2 può essere rilevato in campioni di lavaggio broncoalveolare in pazienti critici con polmonite da COVID-19, anche in assenza di positività nei campioni delle vie respiratorie superiori. Come nel caso dell'aspirato tracheobronchiale, questa procedura può comportare un rischio significativo per l'operatore sanitario che la esegue e non è quindi indicata come esame di routine [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021; Wahidi MM et al, J Bronchology Interv Pulmonol, 2020; Patrucco F et al, Respiration, 2020].

Tamponi rettali e campioni di feci: il virus può essere rilevato in campioni rettali, soprattutto nelle fasi avanzate dell'infezione [Kipkorir V et al, J Med Virol, 2020].

Alcuni pazienti affetti da COVID-19 presentano sintomi digestivi e poiché i pazienti con malattia precoce o lieve possono avere una bassa carica virale nei tamponi nasali e faringei, l'ottenimento di campioni di feci può essere una strategia diagnostica alternativa, anche in assenza di sintomi gastrointestinali [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021, Wang H et al, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2020].

La RT-PCR rimane finora il metodo più utilizzato e il più affidabile per l'individuazione clinica del SARS-CoV-2. La sensibilità di questo metodo dipende solitamente dalla quantità di RNA presente in ogni campione. Tuttavia, questa tecnica non fornisce informazioni per i pazienti che sono già guariti dalla SARS-CoV-2, poiché la carica virale risulta abbattuta dopo la guarigione. Allo stesso modo, i pazienti che si trovano nei primissimi giorni dell'infezione virale potrebbero non rispondere "positivamente" a questo test a causa della quantità insufficiente di virus presente nei tamponi [Filchakova O et al, Talanta, 2022; Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

Un metodo di rilevazione viene accettato come test diagnostico se soddisfa determinati requisiti analitici. Tali requisiti includono un limite di rilevazione sufficientemente basso, un'elevata selettività, sensibilità, accuratezza e, preferibilmente, un'alta velocità di esecuzione del test. Il limite di rilevazione è la più bassa concentrazione del target di rilevazione (analita) che un test può rilevare. Il limite di rilevazione è particolarmente importante poiché lo scopo del test è quello di rilevare il virus a una carica virale molto più bassa di quella riscontrata al momento della comparsa dei sintomi, che per il COVID-19 parte da 10⁴ copie/mL. La maggior parte degli attuali metodi basati sulla PCR ha un limite di rilevazione pari o inferiore a 100 copie/mL, che corrisponde alla rilevazione virale 2-3 giorni prima della comparsa dei sintomi. Il limite di rilevazione definisce la sensibilità di un test, ovvero la capacità del test di rilevare l'infezione virale quando il virus è presente nei campioni [Filchakova O et al, Talanta, 2022].

2. L' antigene virale, attraverso **test antigenici** rapidi (e più economici rispetto alla RT-PCR) che, mediante immunocromatografia a diffusione (a flusso

laterale), possono dare risultati su campioni orofaringei in 15-30 minuti. Questi test possono essere eseguiti solo su tamponi nasofaringei e, essendo qualitativi, non possono quantificare l'antigene presente [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

Un antigene è una particella/frammento/molecola del virus in grado di attivare il sistema immunitario e indurre la risposta immunitaria con produzione di anticorpi contro i patogeni. I test antigenici, a differenza dei metodi basati sulla PCR, hanno come bersaglio i biomarcatori virali, quindi rilevano le componenti virali (ad esempio, la glicoproteina S, la proteina M o la proteina N rilasciata, proteine dello spike, dell'envelope o del nucleocapside) o il virus direttamente senza fasi di amplificazione termica.

Questi test possono essere, quindi, utili per supportare la RT-PCR e accelerare la velocità di rilevamento. Come i metodi basati sulla PCR, i test sugli antigeni rilevano solo l'infezione virale attiva. Poiché gli antigeni precedono gli anticorpi e sono specifici per il bersaglio, potrebbero essere più affidabili dei test anticorpali [Yüce M et al, Biosens Bioelectron, 2021].

I test antigenici, pur essendo più rapidi ed economici rispetto alla RT-PCR, in quanto non richiedono un laboratorio di biosicurezza e possono essere eseguiti presso il normale punto di cura del paziente, presentano comunque dei limiti. Hanno una bassa sensibilità, per cui, spesso, in individui asintomatici, possono portare a falsi negativi. Inoltre, la sensibilità diminuisce se il test viene ritardato dalla raccolta del campione (deve essere eseguito entro meno di due ore dalla raccolta del campione). D'altra parte, la sensibilità aumenta significativamente nei pazienti sintomatici. In ogni caso, la loro specificità è notevolmente alta [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

3. Gli anticorpi prodotti dal sistema immunitario in risposta all'infezione virale, attraverso **test sierologici** che non diagnosticano direttamente la presenza del virus, ma segnalano la presenza di molecole del sistema immunitario (immunoglobuline/anticorpi), come le IgM (Immunoglobuline M) e le IgG (Immunoglobuline G), prodotte dall'organismo in risposta al virus.

Si utilizza la tecnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, saggio immuno-assorbente legato ad un enzima) mirata agli anticorpi [Filchakova O et

al, Talanta, 2022]. Pertanto i test sierologici forniscono una diagnosi indiretta, attraverso la disamina degli individui che hanno sviluppato una risposta immunitaria a causa dell'infezione da SARS-CoV-2. Sono, quindi, utili per una vasta scansione dell'immunità di gregge e per le statistiche sul tasso di mortalità. Aiutano a capire quante persone abbiano già contratto il virus e sviluppato anticorpi protettivi, che possono essere successivamente utilizzati come banca dati per censire potenziali donatori di plasma per il trattamento della malattia [Yüce M et al, Biosens Bioelectron, 2021].

Tuttavia, tale metodica presenta dei limiti in quanto le quantità di anticorpi prodotte nei primi giorni dell'infezione possono essere insufficienti per la rilevazione, in quanto l'organismo non produce immediatamente le immunoglobuline. In particolare le IgG e le IgM specifiche per la SARS-CoV-2 non sono rilevabili nei primi tre giorni di infezione. A partire dal quarto giorno successivo all'infezione, è possibile rilevare gli anticorpi IgM specifici del virus che raggiungono un picco al 20° giorno circa e poi diminuiscono. Gli anticorpi IgG impiegano più tempo a comparire, ma, invece, rimangono elevati per diversi mesi. Inoltre, la durata degli anticorpi prodotti, così come la loro efficacia, è ancora vaga, limitando l'impiego di tali test come solido strumento di diagnosi e sorveglianza [Yüce M et al, Biosens Bioelectron, 2021; Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

Esami di imaging a conferma della diagnosi

A conferma della diagnosi può rivelarsi utile l'imaging radiologico.

Metodi clinici di diagnostica del COVID-19 possono includere radiografia, tomografia computerizzata ed ecografia polmonare [Filchakova O et al, Talanta, 2022].

Essendo il COVID-19 principalmente un'infezione respiratoria, gli esami di imaging del torace sono, pertanto, essenziali per definire il contesto clinico in cui interpretare i risultati degli esami diagnostici eseguiti nella fase acuta dell'infezione, anche se non stabiliscono da soli la diagnosi di malattia. Sono utilizzati, quindi, per supportare la diagnosi, stabilire il contesto clinico e la gravità della malattia polmonare, guidare il trattamento e valutare la risposta terapeutica [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

Esistono diversi esami di imaging del torace da considerare in questo contesto:

Radiografia del torace (CXR): è un esame accessorio essenziale per identificare e confermare la presenza di polmonite da SARS-CoV-2. Le immagini radiologiche più comuni in questi pazienti includono opacità irregolari a chiazze, nebulose, reticolari e bilaterali, anche se, talvolta, la CXR può risultare priva di anomalie in pazienti sintomatici e con RT-PCR positiva [Kobayashi Y et al, Transl Lung Cancer Res, 2013]. In generale, le immagini radiologiche sulla CXR di solito migliorano con il progredire dei sintomi in fase di guarigione, ma molti pazienti continuano a mostrare anomalie anche fino a un mese dopo l'insorgenza dei sintomi [Ding X et al, Eur J Radiol, 2020]. Alcuni studi suggeriscono che i risultati della CXR correlino con l'età dei pazienti: le consolidazioni parenchimali sono i reperti più comuni riscontrabili nei pazienti anziani, mentre le opacità “ground-glass” (“a vetro smerigliato”) tendono a essere più consistenti nei pazienti più giovani [Salehi S et al, AJR Am J Roentgenol, 2020].

Tomografia computerizzata del torace: le immagini della TC nei pazienti con COVID-19 correlano con lo stadio dell'infezione dopo la comparsa dei sintomi. Sono comuni le opacità “a vetro smerigliato” [Kobayashi Y et al, Transl Lung Cancer Res, 2013] bilaterali e periferiche e consolidamenti parenchimali polmonari [Chung M et al, Radiology, 2020].

Queste alterazioni sono comuni nelle prime fasi della malattia (0-2 giorni) e raggiungono il picco circa 10 giorni dopo l'inizio dei sintomi [Pan F et al, Radiology, 2020].

La TC ha un'elevata sensibilità, ma bassa specificità, poiché le stesse immagini possono essere osservate anche in altre malattie respiratorie [Jacobi A et al, Clin Imaging, 2020].

Ecografia polmonare (Lung- Ultrasound, LUS): è un esame utile nei pazienti con sospetto di COVID-19. Essa fornisce informazioni rapide sullo stato del parenchima polmonare. I risultati della LUS dipendono dallo stadio della malattia, dalla gravità del danno polmonare e da eventuali comorbidità. In generale, nei pazienti con COVID-19, si osservano vari gradi di coinvolgimento interstiziale e consolidamento alveolare, soprattutto nei pazienti più gravi. La LUS può essere utile anche per valutare l'eventuale presenza di ARDS da SARS-CoV-2, per monitorare la progressione della malattia in risposta al trattamento stabilito, l'effetto delle manovre di reclutamento

polmonare, la risposta al posizionamento prono e per prendere decisioni relative al trattamento con ventilazione meccanica [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

L'ecografia polmonare presenta notevoli vantaggi, tra cui il fatto che sia una tecnica facilmente eseguibile, è sicura e riproducibile, rapida, a basso costo ed è necessario solo l'operatore sanitario che esegue l'esame, il che riduce anche il rischio di infezione. Eppure proprio il fatto che sia un esame operatore-dipendente potrebbe costituire anche uno dei limiti della tecnica, oltre al fatto che la LUS non rileva le lesioni che non sono a contatto con la pleura a causa dell'aria che si trova tra la sonda e la lesione, pertanto, in questi casi, è necessario integrare l'esame con la CXR o la TC, menzionate in precedenza [Peng QY et al, Intensive Care Med, 2020].

Parametri laboratoristici

Nei pazienti con COVID-19, alcune anomalie biochimiche risultano essere patognomiche e vengono identificate come veri e propri marcatori biochimici:

1. Leucocitosi o leucopenia, di solito accompagnata da linfopenia, eosinopenia e neutrofilia [Chen N et al, Lancet, 2020];
2. Livelli elevati di reagenti infiammatori di fase acuta, come la PCR, la ferritina, l'IL6, la SAA e la procalcitonina [Huang C et al, Lancet, 2020];
3. Marcatori epatici (ALT, AST) alterati (valori di disfunzione epatica indicano la possibile contestuale presenza di epatite) [Huang C et al, Lancet, 2020];
4. Disfunzione renale con livelli alterati di creatinina [Huang C et al, Lancet, 2020];
5. Disturbi della coagulazione, tra cui trombocitopenia o trombocitosi ed elevazione dei livelli di D-dimero (valori elevati di D-dimero correlano con la possibilità di eventi tromboembolici) [Driggin E et al, J Am Coll Cardiol, 2020] ;
6. Aumento della troponina (alti valori di troponina indicano il rischio di infarto miocardico acuto, miocardite, insufficienza cardiaca, aritmie e morte improvvisa) [Bardají A et al, Rev Esp Cardiol, 2021];
7. Diminuzione dei livelli di albumina sierica [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021];
8. Aumento della glicemia [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

Molte di queste anomalie hanno valore prognostico. Ad esempio, valori elevati di glucosio, AST, LDH e creatinina sono predittori di mortalità ospedaliera [Vila Muntadas M et al, Med Clin (Engl Ed), 2021].

Biomarcatori infiammatori come IL6, PCR , conta dei linfociti e livelli di fibrinogeno, invece, sono stati associati alla necessità di ventilazione meccanica nei pazienti con infezione da SARS-CoV-2 [Blake A et al, Med Intensiva (Engl Ed), 2020] .

2. Sindrome Long-COVID

2.1 Definizione e fattori di rischio

Oltre alle manifestazioni cliniche che caratterizzano la fase acuta del COVID-19 già descritte in precedenza, occorre far fronte anche a una sintomatologia che può seguire l'infezione da SARS-CoV-2, caratterizzata da un quadro clinico che comprende complicazioni multisistemiche che si manifestano a lungo termine [Chen C et al, J Infect Dis, 2022; Davis HE et al, EClinicalMedicine, 2021], sequele post acute del COVID-19 comunemente indicate sotto il nome di sindrome Long-COVID [Koc HC et al, Int J Biol Sci, 2022; Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023].

Sebbene la maggior parte dei pazienti sia guarita nelle settimane successive all'infezione acuta, è emersa rapidamente l'evidenza che alcune persone riferissero la persistenza o la comparsa di un'ampia varietà di sintomi con intensità variabile, indipendentemente dalla gravità iniziale della malattia. Pertanto, a Maggio 2020, è stato introdotto il termine sindrome Long-COVID [Castanares-Zapatero D et al, Ann Med, 2022].

Si stima che il 70% di pazienti guariti da COVID-19 possa andare incontro a complicazioni postume. I sintomi persistenti dopo l'infezione possono durare da settimane a mesi, riducendo gravemente la qualità della vita anche dopo che i pazienti sono liberi dal virus [Koc HC et al, Int J Biol Sci, 2022].

La sindrome Long-COVID risulta essere associata a tutte le età, con più alta percentuale di casi diagnosticati tra i 36 e i 50 anni [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023].

I pazienti generalmente presentano una sintomatologia multisistemica con condizioni anche di nuova insorgenza [Davis HE et al, EClinicalMedicine, 2021], tra cui malattie cardiovascolari, trombotiche e cerebrovascolari [Xie Y et al, Nat Med, 2022], diabete mellito di tipo 2 [Xie Y et al, Lancet Diabetes Endocrinol, 2022], encefalomielite mialgica/sindrome da stanchezza cronica (ME/CFS) [Mancini DM et al, JACC Heart Fail, 2021; Kedor C et al, Nat Commun, 2022] e disautonomia, in particolare la sindrome da tachicardia posturale ortostatica (POTS) [Larsen NW et al, Front Neurol, 2022]. I sintomi, come detto prima, possono durare per anni e, soprattutto nei casi di ME/CFS e disautonomia di nuova insorgenza, sono destinati a durare per tutta la vita [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023].

Le sfide della ricerca sono numerose e molte sono le domande ancora aperte, in particolare per quanto riguarda la fisiopatologia, i trattamenti e i fattori di rischio [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023].

Inizialmente, non esisteva una definizione univoca di sindrome Long-COVID accettata a livello globale. Nel dicembre 2020, il National Institute for Health and Care Excellence ha proposto una definizione basata sul tempo trascorso dalla malattia acuta, quando si segnalava l'insorgenza di sintomi non spiegati da una diagnosi alternativa [Castanares-Zapatero D et al, Ann Med, 2022].

È stata, quindi, stabilita una distinzione tra la definizione di "COVID-19 sintomatica in corso", che si applica ai pazienti che riferiscono sintomi tra le 4 e le 12 settimane successive alla fase acuta di malattia, mentre la definizione di "Sindrome post COVID-19" è stata applicata a coloro che presentavano ancora sintomi 12 settimane dopo l'inizio della malattia [Castanares-Zapatero D et al, Ann Med, 2022].

Nell'ottobre 2021, l'OMS ha proposto una definizione per quella che ha definito "condizione post COVID-19". La condizione è stata definita come la presenza di sintomi che duravano da almeno 2 mesi in individui con una storia di infezione da SARS-CoV-2 probabile o confermata. Secondo l'OMS, questa condizione si manifestava solitamente a 3 mesi dall'inizio della malattia acuta e non poteva essere spiegata da una diagnosi alternativa [Castanares-Zapatero D et al, Ann Med, 2022].

A causa della natura emergente e della complessità della patologia, risulta fondamentale la ricerca. Quest'ultima verte a una migliore conoscenza dei meccanismi fisiopatologici sottostanti alla sindrome Long-COVID, pertanto lo studio sulla patologia si arricchisce di nuovi tasselli giorno dopo giorno.

Sulla base di studi recenti sono stati individuati diversi fattori di rischio che influenzano l'insorgenza della sindrome Long-COVID [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023]. Il follow-up dei pazienti guariti dal COVID-19 ha identificato alcuni fattori che sono comunemente associati allo sviluppo di Long COVID [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021] tra cui:

la presenza di più di cinque sintomi nella fase acuta della malattia [Menni C et al, Nat Med, 2020; Sudre CH et al, Nat Med, 2021]. Chi manifesta più di cinque sintomi durante

la prima settimana di infezione ha maggiori probabilità di sviluppare la Sindrome Long COVID, indipendentemente dall'età e dal sesso. I sintomi predittivi di Long COVID che si manifestano nell'infezione iniziale includono affaticamento, cefalea, dispnea e mialgia [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021; Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023];

la presenza di comorbidità come ipertensione, dislipidemia, malattie cardiovascolari, disregolazione metabolica ed endocrina, ad esempio, indice di massa corporea (BMI) >30 e diabete mellito di tipo 2, aumenta il rischio di sviluppare la sindrome post COVID. Nonostante ciò, anche soggetti con sintomi lievi hanno poi presentato i sintomi del Long COVID [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021; Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023];

il sesso: è stato acclarato come il rischio di Long COVID sia più comune nelle donne rispetto agli uomini [Huang B et al, BMC Infect Dis, 2021]. È risultato che le donne abbiano una maggiore prevalenza, una minore mortalità, livelli più bassi di infiammazione, conte linfocitarie più elevate e risposte anticorpali più rapide rispetto agli uomini [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021; Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023];

l'età: l'età avanzata è un fattore di rischio (47% di rischio aumentato nei soggetti sopra i 50 anni) ed è stato riscontrato che i pazienti con sindrome Long-COVID abbiano un'età superiore di circa quattro anni rispetto a quelli che non ne sono affetti [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021; Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023];

2.2 Fisiopatologia

Come detto in precedenza, essendo l'argomento di grande attualità, la ricerca si aggiorna continuamente, pertanto risalire all'eziopatogenesi e ai meccanismi fisiopatologici della sindrome Long-COVID significa interfacciarsi con una serie di ipotesi che sono state formulate sulla base di studi recenti e delle nuove evidenze che emergono giorno dopo giorno sulla patologia.

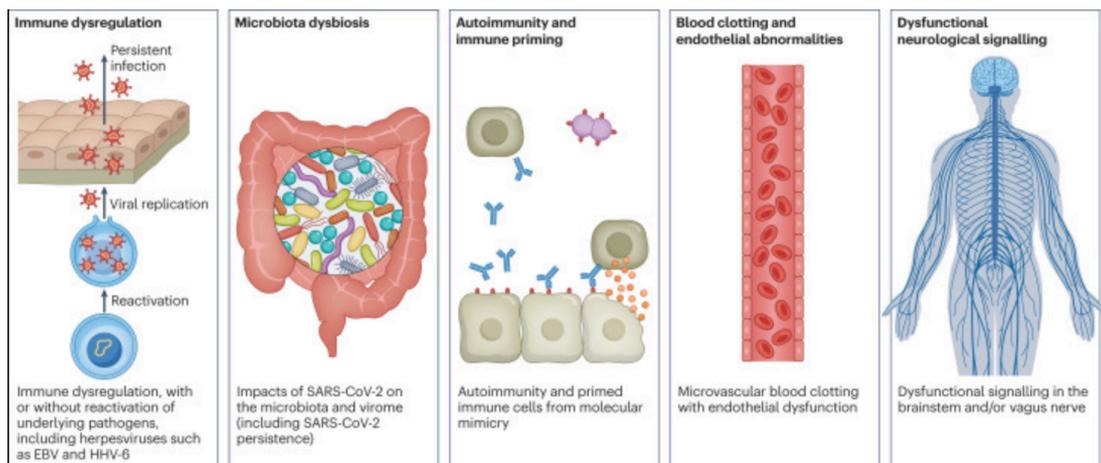


Figura 7: Alcuni dei principali meccanismi che giocano un ruolo chiave nella fisiopatologia della sindrome Long-COVID, tra cui disregolazione immunitaria, alterazione del microbiota, autoimmunità, anomalie della coagulazione e dell'endotelio e disfunzione della segnalazione neurologica. Immagine tratta da un lavoro di Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023.

Tra i processi fisiopatologici che sembrano essere alla base della sindrome Long-COVID, vi sono:

Fattori virali

-Persistenza del virus: vi è una crescente evidenza che, in alcuni pazienti con Long COVID, il SARS-CoV-2 possa persistere nei serbatoi tissutali in forma latente dopo l'infezione acuta [Jacobs JJJ, Med Hypotheses, 2021] e, nascondendosi in vescicole extracellulari, possa attaccare nuovamente vari tessuti e organi attraverso il sistema circolatorio. Questi serbatoi virali nascosti possono innescare risposte immunitarie ripetute che contribuiscono alla persistenza dei sintomi. Mesi dopo l'infezione, l'mRNA virale e la proteina spike del SARS-CoV-2 sono stati rilevati nell'apparato

digerente e nel tratto urinario di pazienti con Long COVID attraverso l'immunofluorescenza e l'analisi PCR di biopsie intestinali. Altri studi, invece, hanno rilevato il SARS-CoV-2 in più organi e nelle feci [Hoang VT et al, J Med Virol, 2020; Kalkeri R et al, Am J Trop Med Hyg, 2020].

- Riattivazione virale: la riattivazione dei virus latenti può avvenire in condizioni di stress o immunosoppressione [Proal AD et al, Front Microbiol, 2021]. Se la risposta immunitaria è indebolita, o disregolata, tali virus possono riattivarsi e alterare l'espressione genica umana, la produzione di proteine e la regolazione immunitaria [Proal AD et al, Front Microbiol, 2021]. Questa sequenza di eventi consente al virus di infettare nuovi siti corporei e di provocare nuovi sintomi cronici. Infatti, è stato dimostrato anche durante e dopo l'infezione da COVID-19, che virus precedentemente dormienti, come EBV (Epstein Barr virus), HSV (Herpes Simplex virus) e HCV (virus dell'epatite C), si riattivano in vari organi [Proal AD et al, Front Microbiol, 2021]. Questi virus sono stati collegati allo sviluppo di diverse patologie croniche, come il morbo di Alzheimer, il cancro, l'artrite reumatoide e il diabete mellito di tipo 1, e potrebbero essere una spiegazione del perché alcuni pazienti sviluppano patologie croniche dopo l'infezione da COVID-19 [Proal AD et al, Front Microbiol, 2021].

-Azione batteriofaga del SARS-CoV-2: È stato, inoltre, dimostrato come il SARS-CoV-2 possa infettare e replicarsi nei batteri intestinali, agendo in un certo senso come un batteriofago. Questa persistenza virale potrebbe anche spiegare in parte la disbiosi intestinale osservata nei pazienti con Long COVID, perché l'azione batteriofaga del SARS-CoV-2 può promuovere direttamente la replicazione di alcuni batteri, causando uno squilibrio nel microbiota intestinale. Ciò può contribuire ulteriormente all'infiammazione cronica, alla disfunzione endoteliale e all'ipercoagulazione osservate nel Long COVID [Brognia C et al, Vaccines (Basel), 2022].

Fattori dell'ospite

Infiammazione cronica e disregolazione immunitaria: come detto in precedenza, nella fase acuta dell'infezione da SARS-CoV-2, si verifica la cosiddetta tempesta citochinica, dove in risposta al virus il sistema immunitario stimola l'attivazione delle cellule T e il rilascio di diverse molecole infiammatorie, come citochine, interleuchine e chemochine [Patterson BK et al, Front Immunol, 2021; Scaglioni V et al, Scand J Immunol,

2020]. Con l'intensificarsi della tempesta di citochine, aumentano drasticamente i livelli di molecole infiammatorie (la SAA, il vWF, l'IL6, l'IL8, l'IL10 e il TNF α) [Patterson BK et al, Front Immunol, 2021].

Nella malattia grave vi è, inoltre, linfopenia con carenza di linfociti B e T [Tavakolpour S et al, Immunol Lett, 2020]. Questo quadro può portare a iperinflamazione [Tavakolpour S et al, Immunol Lett, 2020], poiché i linfociti partecipano alla risoluzione dell'infiammazione dopo l'infezione [Kong M et al, Epidemiol Infect, 2020]. La riduzione del numero di cellule T e B è, inoltre, fortemente associata alla persistenza del virus SARS-CoV-2, che può contribuire ulteriormente all'attivazione immunitaria cronica nella sindrome Long-COVID [Hu F et al, Cell Mol Immunol, 2020].

Attivazione dei mastociti: è stato ipotizzato che l'iperinflamazione nella fase acuta del COVID-19 e nel Long COVID sia mediata, in parte, dall'attivazione dei mastociti. Quest'ultima è stata ipotizzata essere, quindi, anche causa dei sintomi del Long COVID [Weinstock LB et al, Int J Infect Dis, 2021; Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

Infatti, l'attivazione dei mastociti può degenerare nella sindrome da attivazione dei mastociti (MCAS), che, a causa del rilascio sregolato di mediatori chimici, determina l'insorgenza di sintomi allergici gravi e ripetuti che interessano diversi apparati, tra cui allergie alimentari, orticaria, disturbi gastrointestinali, respiro corto e affanno, tutti sintomi riportati anche nel Long COVID [Afrin LB et al, Brain Behav Immun, 2015].

I meccanismi proposti per l'attivazione della MCAS nel Long COVID includono la disregolazione dei geni da parte del SARS-CoV-2, con conseguente perdita della regolazione genetica dei mastociti, nonché lo sviluppo di autoanticorpi che reagiscono con i recettori delle immunoglobuline sui mastociti. Pertanto mastociti incontrollati e risposte aberranti possono essere in parte alla base della fisiopatologia della sindrome Long-COVID [Weinstock LB et al, Int J Infect Dis, 2021].

Autoimmunità: diversi studi suggeriscono che l'autoimmunità abbia un ruolo nella fisiopatologia dell'infezione da SARS-CoV-2, sia durante la malattia acuta che nel Long COVID. Ad esempio sono stati rilevati autoanticorpi antifosfolipidi nel 52% dei campioni di siero di pazienti ricoverati; ciò è direttamente correlato all'iperattività dei neutrofili e a esiti clinici più gravi [Zhou Y et al, Clin Transl Sci, 2020]. Numerosi studi hanno anche identificato autoanticorpi contro gli interferoni e i neutrofili [Zhou Y et al,

Clin Transl Sci, 2020]. Nei sieri dei pazienti affetti da COVID-19 sono stati dimostrati anche autoanticorpi funzionali diretti contro i recettori accoppiati a proteine G, associati alla gravità della malattia [Wallukat G et al, J Transl Autoimmun, 2021].

-Anomalie del tessuto connettivo Come accennato in precedenza, nella circolazione sistemica dei pazienti con Long COVID sono stati riscontrati diversi autoanticorpi. In effetti, dopo il COVID-19, sono stati segnalati disturbi del tessuto connettivo, come artrite, lupus e miosite [Gavrilova N et al, Pathophysiology, 2022]. Questi possono essere determinati dalla presenza di precipitati di autoanticorpi che attaccano il tessuto connettivo e il muscolo [Gavrilova N et al, Pathophysiology, 2022]. Inoltre, il quadro di iperinfiammazione presente nel Long COVID può determinare una maggiore lassità del tessuto connettivo [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

Carenza di melatonina: si ipotizza che pazienti con carenza di melatonina potrebbero essere maggiormente esposti al rischio di sviluppare Long COVID [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023]. La melatonina è un ormone del sonno con diverse caratteristiche che aiutano a combattere le infezioni virali. È stato dimostrato che la melatonina riduce in modo efficace una risposta immunitaria innata iperattiva, abbassando così i livelli di infiammazione [Jarrott B et al, Pharmacol Res Perspect, 2022; Tan DX et al, Life Sci, 2022]. Inoltre, favorisce la risposta immunitaria adattativa, con conseguente aumento della formazione di anticorpi, inibendo così l'ingresso dei virus nelle cellule e limitandone la replicazione [Jarrott B et al, Pharmacol Res Perspect, 2022]. Infatti, è stato dimostrato che, nell'infezione acuta da SARS-CoV-2, pazienti con livelli più elevati di melatonina presentassero una mortalità inferiore [Jarrott B et al, Pharmacol Res Perspect, 2022].

Impatti a valle nell'ospite:

Danno tissutale dovuto all'infezione iniziale da COVID-19: come discusso precedentemente, il SARS-CoV-2 può determinare una vera e propria compromissione multiorgano. Oltre alle lesioni polmonari, più comuni nei pazienti dato che il virus si trasmette per via aerea [Yong SJ, Infect Dis (Lond), 2021], sono state segnalate anche anomalie strutturali del cervello e del metabolismo, direttamente associate a sintomi

neurologici continui, come perdita di memoria, anosmia e astenia [Yong SJ, Infect Dis (Lond), 2021; Jarrahi A et al, J Neuroinflammation, 2020], anomalie cardiache e infiammazione del miocardio, spie di un sottostante danno cardiaco [Helms J et al, Intensive Care Med, 2022] e altre anomalie radiologiche sono state osservate nel fegato, nel pancreas, nei reni e nella milza [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023; Yong SJ, Infect Dis (Lond), 2021]. Nonostante tale evidenza, tutto ciò non spiega completamente le diverse anomalie osservate nel Long COVID. È sempre più chiaro che il coinvolgimento multiorgano osservato nel COVID-19 sia dovuto alla diffusione del virus per via oro-sistemica. Il virus dalla bocca può diffondersi a diversi organi attraverso il sangue. È probabile che il virus, una volta penetrato negli organi, stimoli la trombosi microvascolare in situ, determinando le molteplici caratteristiche cliniche e radiologiche della fase acuta della malattia. La prosecuzione di tale processo può contribuire al coinvolgimento continuo multiorgano nella sindrome Long-COVID [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

Ipossia tissutale: nei pazienti con COVID-19 la presenza di alterazioni vascolari polmonari, con danni endoteliali estesi e trombosi, è fortemente correlata alla scarsa ossigenazione polmonare [Wichmann D et al, Ann Intern Med, 2020]. La conseguente ipossiemia arteriosa sistemica può causare ipossia tissutale in tutto l'organismo [Wang C et al, Front Cell Infect Microbiol, 2022].

In queste condizioni di ipossia, le cellule immunitarie possono essere attivate per produrre citochine infiammatorie, che possono intensificare ulteriormente la disfunzione capillare. Pertanto l'ipossia polmonare causa indirettamente ipossia tissutale in tutto il corpo, e il SARS-CoV-2 può anche legarsi alle cellule endoteliali in vari tipi di tessuto, alterando la morfologia cellulare e inducendo le cellule endoteliali a subire apoptosi.

A causa dell'infiammazione cronica nel Long COVID, i neutrofili, se iperattivati, essendo più grandi degli eritrociti e del diametro medio dei capillari, possono ostruire il flusso capillare [Harris AG et al, Am J Physiol, 1993]. Pertanto, nel Long COVID, persistono risposte infiammatorie aberranti e disregolazione immunitaria [Ryan FJ et al, BMC Med, 2022] e, analogamente alla fase acuta del COVID-19, l'adesione dei neutrofili iperattivati ai capillari nei polmoni, nel cervello, nel cuore e in altri organi può contribuire all'insorgenza dei sintomi [Wang D et al, JAMA, 2020]. I pazienti possono presentare microcoaguli di fibrina amiloide che favoriscono l'ipossia tissutale

e l'alterazione degli scambi di ossigeno [Kell DB et al, Biochem J, 2022]. Questi microcoaguli sono resistenti alla fibrinolisi e possono ostruire i capillari, causando, così, ipossia tissutale. Se l'ossigeno fornito ai tessuti aerobici viene limitato e poi rapidamente ripristinato ("riperfusion"), può causare gravi danni ai tessuti. Questo fenomeno è noto come danno da ischemia-riperfusion [Kell DB et al, Biochem J, 2022]. Il processo comporta la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che aumentano lo stress ossidativo. Lo stress ossidativo si riferisce a uno squilibrio tra il tasso di produzione di ROS e di specie azotate reattive e la loro eliminazione attraverso gli antiossidanti [Kell DB et al, Biochem J, 2022]. È noto che lo stress ossidativo favorisca la produzione di citochine infiammatorie e viceversa: si alimenta, dunque, un vero e proprio circolo vizioso [Kell DB et al, Biochem J, 2022] dove l'ipossia tissutale può protrarsi per mesi e contribuire all'ampio ventaglio di sintomi osservati nella sindrome Long-COVID [Kell DB et al, Biochem J, 2022].

Disbiosi dell'ospite: interazioni del SARS-CoV-2 con il microbioma dell'ospite: diversi studi suggeriscono che il COVID-19 promuova una disbiosi microbioma/viroma che potrebbe causare sintomi persistenti. Uno studio ha rivelato che il microbioma nel liquido broncoalveolare di pazienti con COVID-19 mostrava un aumento dei batteri patogeni e livelli più elevati di batteri commensali del cavo orale e delle vie respiratorie superiori rispetto ai pazienti sani [Shen Z et al, Clin Infect Dis, 2020]. Inoltre, il microbioma intestinale dei pazienti con COVID-19 è caratterizzato dall'aumento di patogeni opportunisti e dalla riduzione di specie benefiche [Zuo T et al, Gastroenterology, 2020].

La disbiosi microbioma/viroma può disturbare l'omeostasi e il funzionamento delle vie di segnalazione dell'ospite in modo da facilitare lo sviluppo di malattie croniche [Proal AD et al, Discov Med, 2017]. La disbiosi è accompagnata da infiammazione che può provocare disfunzione e rottura dei rivestimenti epiteliali intestinali [Proal AD et al, Discov Med, 2017]. A sua volta ciò può causare un aumento della permeabilità epiteliale che consente agli agenti patogeni di migrare nel sangue, dove la loro presenza può contribuire a una serie di processi infiammatori sistemici. Pertanto, anche in questo caso, tutto ciò può provocare danni endoteliali e ipercoagulazione [Proal AD et al, Discov Med, 2017].

Disfunzione del sistema nervoso autonomo: i pazienti con Long COVID presentano un'alta percentuale di sintomi correlati alla disautonomia, come intolleranza ortostatica, affaticamento, palpitazioni, deterioramento cognitivo, nausea e disregolazione della temperatura [Davis HE et al, EClinicalMedicine, 2021].

Le cause potenziali della disautonomia nel Long COVID sono ascrivibili a:

Danni dovuti a infezioni o infiammazioni dirette: Il SARS-CoV-2 infetta e replica il suo RNA e le sue proteine spike in modo diffuso sia nel sistema nervoso periferico che in quello centrale [Jarrahi A et al, J Neuroinflammation, 2020]. Il danno associato a un'infezione passata o a un'infezione persistente dei nervi vago o trigemino può essere alla base dei sintomi della disautonomia [Moyano A JR et al, IDCases, 2021; Sarubbo F et al, Brain Behav Immun Health, 2022].

L'ipovolemia relativa dovuta alla mancata vasocostrizione periferica, che è una caratteristica sia della POTS sia dell'ipotensione ortostatica (OH) [Vernino S et al, Auton Neurosci, 2021]; ciò provoca una riduzione della gittata cardiaca, con conseguente compromissione dell'apporto di ossigeno ai tessuti e quindi tutto ciò può portare a tachicardia compensatoria [Stewart JM et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004].

L' ipoperfusione cerebrale [van Campen CLMC et al, Clin Neurophysiol Pract, 2020].

La neuropatia a piccole fibre (definita come "danno preferenziale alle fibre nervose non mielinizzate o poco mielinizzate del gruppo C o A") che è stata documentata nel Long COVID ed è una causa riconosciuta di disautonomia in questa condizione [Novak P, eNeurologicalSci, 2020]. La neuropatia a piccole fibre nel Long COVID deriva da autoanticorpi [Zhou Y et al, Clin Transl Sci, 2020], associati anche alla POTS e all' OH [Ruzieh M et al, Scand Cardiovasc J, 2017], o dall'ischemia delle piccole fibre dovuta ai microcoaguli [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

I meccanismi fisiopatologici illustrati culminano nella persistenza a lungo termine del disturbo, caratterizzato da endotelite trombotica, infiammazione endoteliale, iperattivazione piastrinica e microcoaguli. Questi fattori, nonché l'interazione tra infiammazione sistemica e coagulazione, fanno sì che vi sia una coagulazione anomala, dovuta principalmente al fallimento del sistema fibrinolitico.

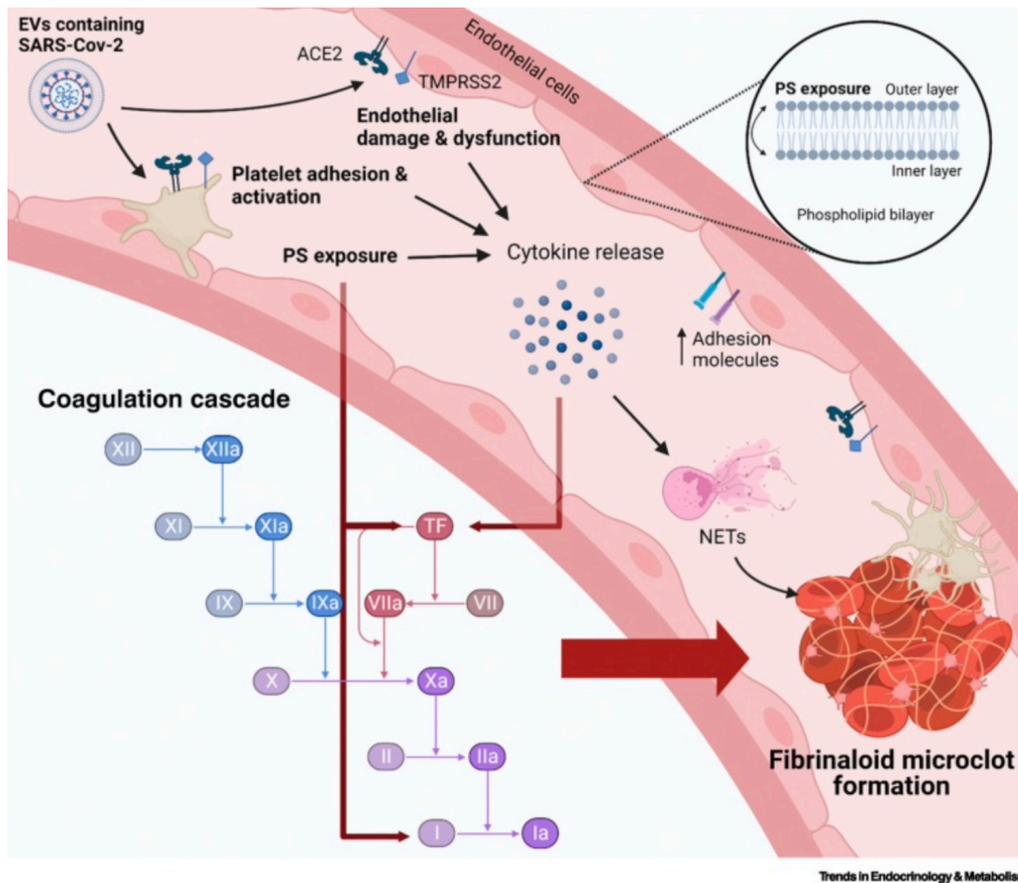


Figura 8: Principali meccanismi fisiopatologici nel COVID-19 e nel Long COVID che portano a iperattivazione dei fattori procoagulanti all'interno della cascata della coagulazione con conseguente formazione di microcoaguli resistenti alla fibrinolisi. Immagine tratta da un lavoro di Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023.

Le conseguenti anomalie dei vasi sanguigni e dei fattori della coagulazione interessano tutti gli organi e rappresentano un tratto comune alla base della fisiopatologia e dei sintomi della sindrome Long-COVID [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

Come detto in precedenza, nel Long COVID il SARS-CoV-2 può infiltrarsi nelle EVs e attaccare nuovamente vari tessuti e organi attraverso il sistema circolatorio [Jacobs JLL, Med Hypotheses, 2021].

Quando il SARS-CoV-2 si lega alle cellule endoteliali e alle piastrine attraverso i recettori ACE2/TMPRSS2, promuove la disfunzione endoteliale e l'iperattivazione piastrinica, favorendo così l'attivazione della cascata coagulativa e la formazione di microcoaguli trombotici [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023]. Ciò avviene perché la disfunzione endoteliale e l'iperattivazione piastrinica possono portare all'esposizione di fosfatidilserina (PS) nella membrana cellulare esterna. L'esposizione della PS può promuovere direttamente alcuni fattori della cascata coagulativa, come il

fattore tissutale (TF). Il TF è anche un complesso con il fattore VIIa della coagulazione (FVIIa) e fornisce siti di legame per i complessi procoagulanti, portando alla formazione di trombina. La trombina è coinvolta nella fase finale della cascata coagulativa e promuove la conversione della fibrina in fibrinogeno, causando la coagulazione. Inoltre, il danno endoteliale e l'esposizione di fosfatidilserina inducono le cellule endoteliali e le piastrine a produrre varie citochine, con conseguente infiammazione sistemica cronica. Le citochine, a loro volta, possono anche stimolare direttamente il fattore tissutale all'interno della cascata della coagulazione e la formazione di NET per indurre la trombosi. La persistenza del SARS-CoV-2 che promuove l'infiammazione cronica nel Long COVID può essere un meccanismo che stimola le cellule endoteliali, le piastrine e altre cellule infiammatorie. Ciò favorisce l'iperattivazione dei fattori procoagulanti all'interno della cascata della coagulazione e, in ultima analisi, la formazione di microcoaguli resistenti alla fibrinolisi (**Figura 8**). [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023]

2.3 Clinica

Dati ai meccanismi fisiopatologici precedentemente illustrati, appare evidente come anche nella sindrome Long-COVID il quadro clinico faccia riferimento a una sintomatologia multisistemica con molteplici manifestazioni. (*Figura 9*)

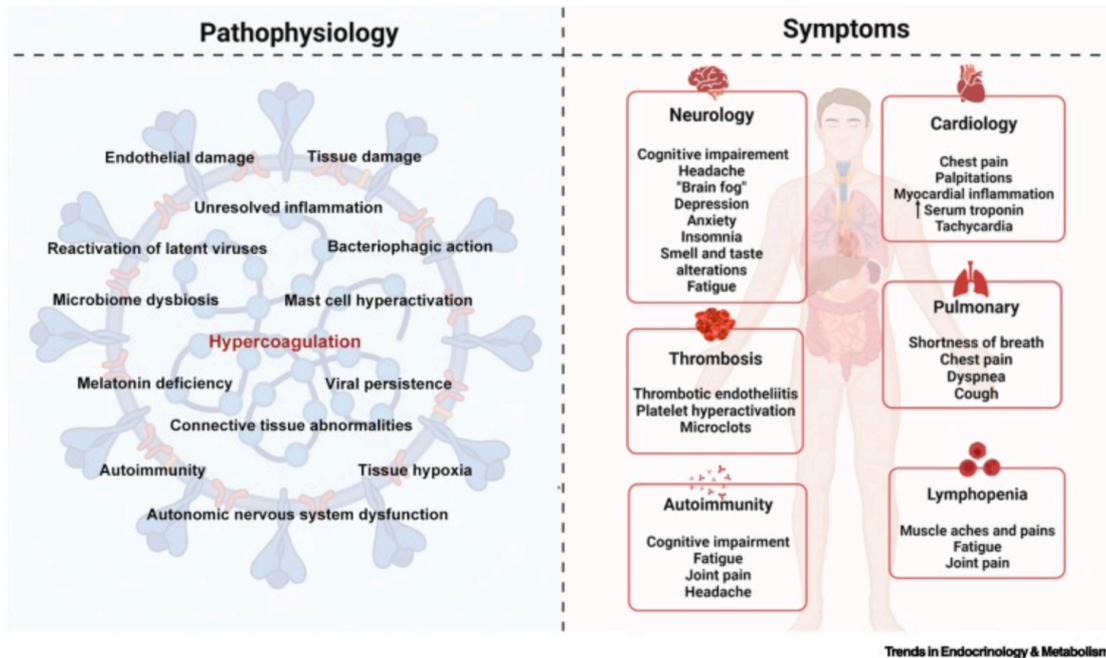


Figura 9: Possibili fattori fisiopatologici della sindrome Long-COVID e manifestazioni sintomatologiche conseguenti. Immagine tratta da un lavoro di Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023.

Poiché i disturbi riferiti possono sovrapporsi a diverse altre condizioni non specificamente correlate al COVID-19, come esacerbazione di condizioni di salute preesistenti, rimane una sostanziale incertezza sul motivo per cui si manifestano sintomi di lunga durata. Probabilmente i pazienti possono presentare sintomi in seguito a un danno d'organo sviluppatosi durante la fase acuta della malattia, mentre altri manifestano sintomi di nuova insorgenza in seguito a un'infezione lieve, senza alcuna evidenza di danno d'organo o tissutale acquisito [Castanares-Zapatero D et al, Ann Med, 2022].

Illustrando il quadro clinico, possiamo trovarci davanti alla persistenza di uno o più sintomi riscontrati anche nella fase acuta del COVID-19, oppure potrebbe esserci la

comparsa di nuovi sintomi. La maggior parte dei pazienti con sindrome Long-COVID è PCR negativa, il che indica una guarigione microbiologica. Assistiamo, dunque, ad una condizione dove la guarigione microbiologica non corrisponde alla guarigione clinica [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021] .

In base alla durata dei sintomi, la sindrome Long-COVID può essere suddivisa in due stadi: la **sindrome Long-COVID post acuta**, in cui i sintomi si protraggono per oltre 3 settimane, ma meno di 12 settimane, e la **sindrome Long-COVID cronica**, in cui i sintomi si protraggono per oltre 12 settimane [Greenhalgh T et al, BMJ, 2020] (**Figura 10**).

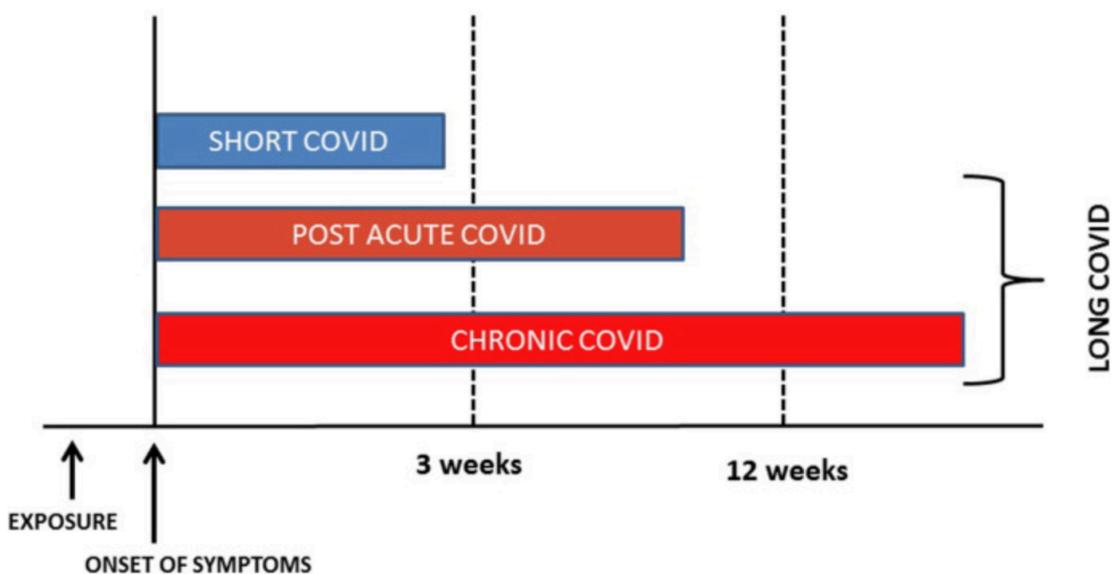


Figura 10: Classificazione della sindrome Long-COVID. Immagine tratta da un lavoro di Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021.

Pertanto, tra i pazienti infettati da SARS-CoV-2, la presenza di uno o più sintomi continui o recidivanti e remittenti, di vecchia o nuova insorgenza, anche dopo il periodo previsto di recupero clinico, indipendentemente dal meccanismo di base, viene definita come sindrome Long-COVID [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021].

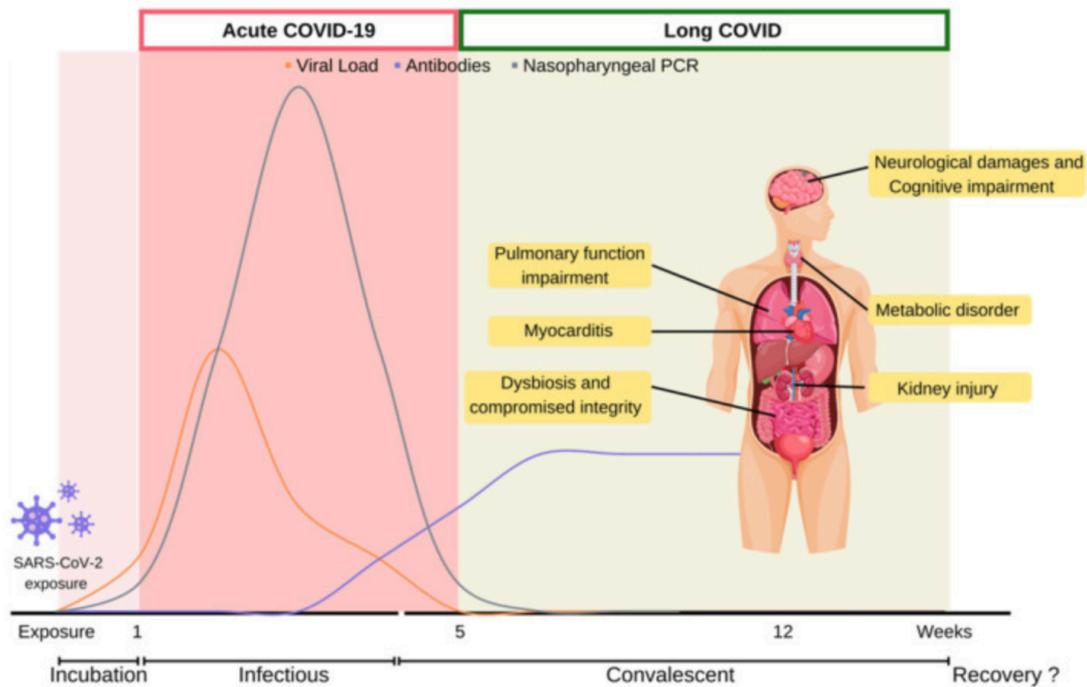


Figura 11: Decorso della malattia nel COVID-19 e nel Long COVID: la fase acuta del COVID-19 è rappresentata in più momenti, a seconda della conta virale e dei sintomi presentati nel tempo. La fase acuta dell'infezione dura cinque settimane dall'inizio dei sintomi. I sintomi persistenti e le complicazioni a lungo termine oltre le cinque settimane dall'infezione COVID-19 rientrano nel Long COVID. Nella fase del Long COVID sono illustrati alcuni dei principali sintomi. Immagine tratta da un lavoro di Koc HC et al, *Int J Biol Sci*, 2022.

I sintomi più comuni riscontrati nei pazienti con sindrome Long-COVID, alcuni dei quali vengono segnalati per la prima volta dopo l'insorgenza dei sintomi acuti, sono astenia, dispnea, tosse, dolore toracico, palpitazioni, cefalea, dolori articolari, mialgia e debolezza, insonnia, diarrea, eruzione cutanea, perdita di capelli, alterazione dell'equilibrio e dell'andatura, problemi neurocognitivi, tra cui problemi di memoria e concentrazione. Quindi, in generale, si assiste a un vero e proprio peggioramento della qualità della vita con una sintomatologia che riflette un danno cronico da ricondurre principalmente alla persistenza di un'inflammazione di fondo [Raveendran AV et al, *Diabetes Metab Syndr*, 2021].

Analogamente al quadro clinico della fase acuta del COVID-19, anche qui ci troviamo davanti a una sintomatologia multisistemica che include:

Coinvolgimento polmonare e disturbi delle vie aeree superiori (respiro corto, mal di gola, tosse persistente e perdita dell'olfatto). Essendo un virus respiratorio, l'infezione da SARS-CoV-2 porta a disfunzioni del sistema respiratorio nel Long COVID [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021] .

Il SARS-CoV-2 infetta inizialmente l'epitelio alveolare e induce risposte infiammatorie croniche che innescano la produzione di citochine infiammatorie e di ROS [Yuki K et al, Clin Immunol, 2020]. Il danno cellulare porta a disfunzione d'organo, quindi a disfunzione del sistema respiratorio. L'interruzione dell'integrità cellulare attiva i fibroblasti a depositare collagene e fibronectina, portando a cambiamenti fibrotici del tessuto polmonare. A lungo termine, l'attivazione del complemento indotta dai virus e la successiva interruzione delle vie coagulative favoriscono lo sviluppo di un'infiammazione prolungata e di uno stato di ipercoagulabilità, predisponendo il paziente al rischio di trombosi [Crook H et al, BMJ, 2021].

Pertanto, gli effetti protratti dell'infezione possono portare a malattia polmonare fibrotica (fibrosi post COVID o fibrosi post ARDS) [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021].

La fibrosi polmonare è una tra le principali complicanze a lungo termine del COVID-19. Generalmente, si verifica in seguito a gravi infiammazioni e lesioni respiratorie [Ojo AS et al, Pulm Med, 2020]. L'esposizione prolungata all'ossigeno supplementare, nei casi più gravi di malattia, potrebbe portare a un aumento dello stress ossidativo all'interno dei polmoni, contribuendo così a mantenere lo stato infiammatorio e favorendo l'attivazione di vie fibrotiche [Tanni SE et al, Expert Rev Respir Med, 2021]. Il danno fibroproliferativo polmonare è stato evidenziato in campioni autoptici di pazienti deceduti a causa del COVID-19 [De Michele S et al, Am J Clin Pathol, 2020] in combinazione con danni endoteliali e angiogenesi.

La fibrosi polmonare porta a conseguente persistenza della dispnea [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021]. La dispnea, in assenza di lesioni polmonari, potrebbe ipoteticamente essere correlata a un'inappropriata regolazione della ventilazione derivante da disturbi del sistema nervoso autonomo (potenziali danni ai recettori riflessi intratoracici o alle zone corticali del tronco encefalico/cerebrale) [Tanni SE et al, Expert Rev Respir Med, 2021].

Gli effetti protratti dell'infezione da SARS-CoV-2 possono portare anche a tosse cronica, bronchiectasie e malattia vascolare polmonare [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021]. I sintomi respiratori a lungo termine possono essere causati, quindi, da disturbi vascolari polmonari. Il danno microvascolare polmonare, a livello dei capillari sembra giocare un ruolo chiave poiché potrebbe portare all'ipertensione polmonare [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021] .

Coinvolgimento cardiovascolare e problemi cardiaci che, talvolta, si manifestano nel Long COVID dopo la guarigione dalla malattia acuta [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021].

Il persistere di anomalie cardiache può essere secondario al danno miocardico verificatosi durante l'infezione acuta e consecutivo alla limitata perfusione coronarica o alla grave ipossia [Wichmann D et al, Ann Intern Med, 2020]. Tuttavia, i meccanismi che perpetuano i sintomi cardiaci a lungo termine possono anche derivare da disturbi microvascolari indotti dal virus o dall'infiammazione miocardica.

L'abbondanza di recettori ACE2 sui cardiomiociti fornisce una via diretta per l'infezione da SARS-CoV-2. L'infiammazione cronica dei cardiomiociti può portare a miosite e morte cellulare [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021]. L'infiammazione prolungata e il danno cellulare comportano rimodellamenti strutturali e cambiamenti fibrotici che possono condurre all'insorgenza di insufficienza cardiaca e aritmie [Wang C et al, Front Cell Infect Microbiol, 2022]. Inoltre, la disfunzione endoteliale può provocare microtrombi che compromettono un'adeguata vascolarizzazione (*Figura 12*).

L'infiammazione miocardica persistente e l'aumento del livello di troponina cardiaca sono comunemente presenti nei pazienti nel post COVID. Pertanto, piuttosto comuni risultano essere sintomi come alterazioni della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa, miocardite e pericardite, riduzione della riserva di flusso miocardico a causa di lesioni microvascolari, infarto miocardico, insufficienza cardiaca, aritmie e morte cardiaca improvvisa. Possono verificarsi anche aneurisma coronarico, aneurisma aortico, aterosclerosi accelerata, malattia tromboembolica venosa e arteriosa, compresa l'embolia polmonare potenzialmente letale [Becker RC, J Thromb Thrombolysis, 2020].

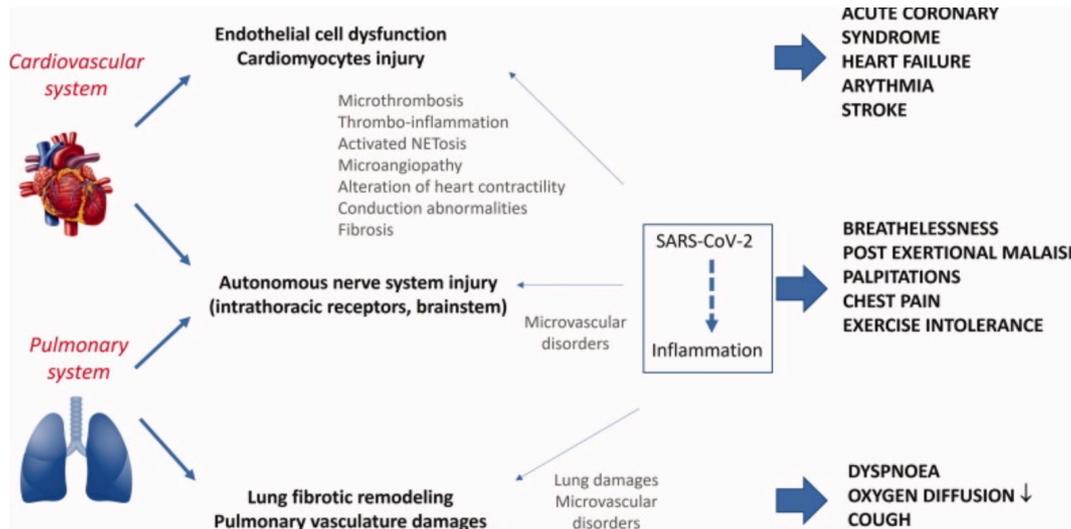


Figura 12: *Principali meccanismi coinvolti nell' insorgenza della sintomatologia cardio-respiratoria nella sindrome Long-COVID. Immagine tratta da un lavoro di Castanares-Zapatero D et al, Ann Med, 2022.*

I disturbi cardiovascolari possono anche derivare da disturbi del sistema nervoso autonomo. Infatti l'infiammazione del sistema nervoso autonomo potrebbe progredire fino alla POTS [Goldstein DS, Heart Rhythm, 2021]. Quest'ultima potrebbe essere causata dal virus o da una disfunzione autoimmune derivante da disturbi del sistema nervoso autonomo ovvero da potenziali danni ai recettori riflessi intratoracici o alle zone corticali del tronco encefalico/cerebrale [Goldstein DS, Heart Rhythm, 2021]. Per questo motivo, sono stati identificati anticorpi contro i recettori delle catecolamine in grado di modulare la frequenza cardiaca, oltre ad autoanticorpi contro il recettore ACE2 e l'endotelina nei pazienti con POTS [Wallukat G et al, J Transl Autoimmun, 2021].

Il coinvolgimento neurologico nel Long COVID sembra essere uno dei tratti salienti della sintomatologia: la presenza del SARS-CoV-2 nel liquor mostra le sue caratteristiche neuroinvasive e la possibile alterazione dell'integrità microstrutturale e funzionale del cervello nei pazienti nel post COVID-19 [Moriguchi T et al, Int J Infect Dis, 2020]. I sintomi cognitivi sono stati riportati, infatti, come sintomi principali del Long COVID ed è stato riferito che essi si svilupperebbero nelle fasi successive della malattia [Koc HC et al, Int J Biol Sci, 2022].

Le sequele neurologiche persistenti potrebbero derivare da danni cerebrali insorti nella fase acuta del COVID, tra cui ictus, encefalite e Sindrome di Guillain Barré [Ren AL

et al, J Neurol, 2021]. Invece altri sintomi neurologici, tra cui disturbi cognitivi o mentali, cefalea e disfunzioni olfattive/gustative, potrebbero anche non essere correlate alla fisiopatologia della fase acuta.

I possibili meccanismi alla base di queste neuropatologie includono:

La neuroinfiammazione [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023]: è stato ipotizzato che la diffusione del SARS-CoV-2 nel cervello (attraverso la cavità nasale o il flusso sanguigno) possa innescare la neuroinfiammazione, il cui ruolo verrebbe avvalorato dalla presenza dei sintomi: la neuroinfiammazione cronica attiva le cellule gliali portando a disturbi neurodegenerativi, deterioramento neurocognitivo e disturbi mentali [Ren AL et al, J Neurol, 2021; Gasmi A et al, Mol Neurobiol, 2021]. Il SARS-CoV-2 può penetrare la BEE e il successivo danneggiamento della permeabilità della BEE favorisce ulteriormente la neuroinfiammazione nel parenchima cerebrale e lesioni neuronali.

Coagulopatia e disfunzione endoteliale: i danni a livello vascolare sono responsabili di condizioni patologiche da iperinfiammazione e da ipercoagulabilità e possono aumentare il rischio di eventi trombotici [Sun B et al, Cells, 2021], inoltre è stato dimostrato che la microtrombosi locale derivante dall'ipercoagulazione possa contribuire anch'essa alla sintomatologia (*Figura 13*).

Inoltre, l'iperinfiammazione nel tronco encefalico può portare a disfunzioni autonome [Koc HC et al, Int J Biol Sci, 2022].

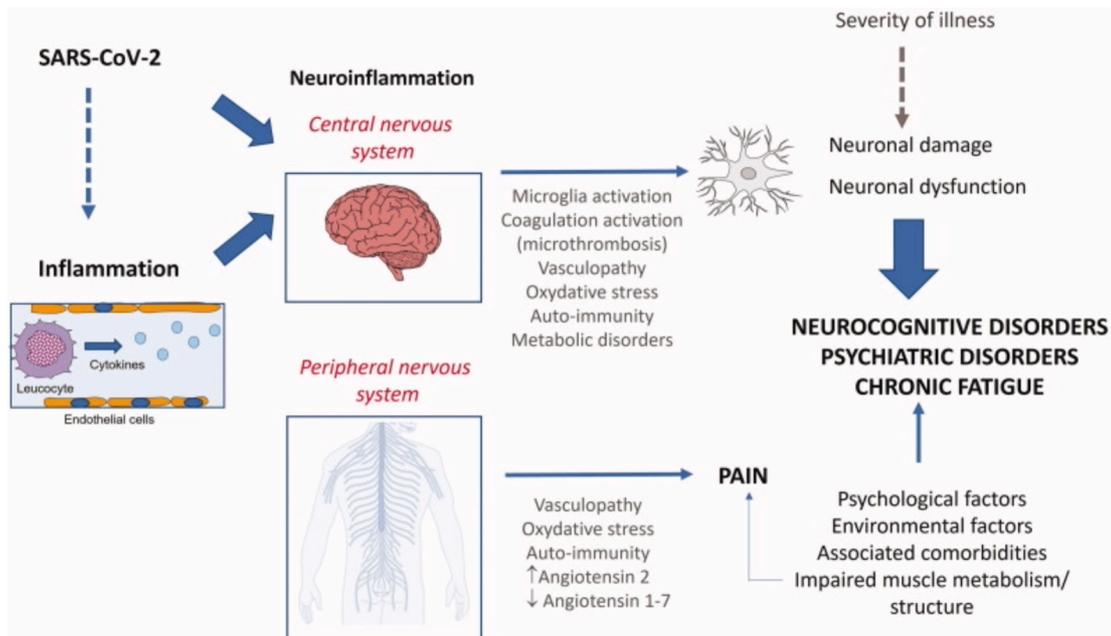


Figura 13: Neuroinfiammazione: diversi meccanismi fisiopatologici potenzialmente in grado di portare alla persistenza dei sintomi neurologici nella sindrome Long-COVID. Immagine tratta da un lavoro di Castanares-Zapatero D et al, *Ann Med*, 2022.

Alcuni studi hanno evidenziato aspetti analoghi alla malattia di Alzheimer in pazienti con sindrome Long-COVID [Reiken S et al, *Alzheimers Dement*, 2022]: peptidi che si auto-assemblano in agglomerati amiloidi tossici per i neuroni, neuroinfiammazione diffusa, ipometabolismo cerebrale e del tronco encefalico correlato a sintomi specifici e reperti di liquido cerebrospinale anormale in individui affetti, oltre al fatto che vi sia un'associazione tra età più giovane e insorgenza ritardata dei sintomi neurologici [Apple AC et al, *Ann Clin Transl Neurol*, 2022].

Ad avvalorare queste tesi, sono stati condotti diversi studi: alla risonanza magnetica sono state riscontrate alterazioni strutturali del cervello in pazienti sintomatici guariti dal COVID-19, [Lu Y et al, *EClinicalMedicine*, 2020]. Sono state evidenziate modifiche strutturali in diverse regioni cerebrali, tra cui ippocampo, lobo insulare e corteccia olfattiva. È stata riscontrata una riduzione dello spessore della materia grigia nella corteccia orbitofrontale e nel giro paraippocampale, una riduzione complessiva delle dimensioni del cervello correlata a maggiore declino cognitivo. Il volume della materia grigia in regioni cerebrali come l'ippocampo o il giro del cingolo risulta essere correlato alla perdita di memoria o dell'olfatto [Lu Y et al, *EClinicalMedicine*, 2020]. Un

altro studio ha riportato una diminuzione dello spessore corticale, associata a modifiche della microstruttura della materia bianca, insieme a una diminuzione del flusso ematico cerebrale regionale nelle regioni frontali e limbiche [Lu Y et al, EClinicalMedicine, 2020]. È stato, inoltre, messo in luce il fatto che i markers di disfunzione neuronale fossero aumentati nei pazienti nel post COVID-19 rispetto a soggetti esenti da malattia [Sun B et al, Cells, 2021]: sono stati riscontrati livelli anormali di proteine mitocondriali e di proteine spike e nucleocapside del SARS-CoV-2 nel SNC [Chan KH et al, Am J Emerg Med, 2020].

Disfunzioni del sistema nervoso centrale in risposta alla neuroinfiammazione possono contribuire al deterioramento cognitivo a lungo termine e, pertanto, all'insorgenza di anomalie neuropsichiatriche, tra cui cefalea, tremore, problemi di attenzione e concentrazione, offuscamento cognitivo, "nebbia cerebrale," "brain fog" (alcuni studi hanno identificato nei pazienti con questo sintomo un'alterazione dei circuiti intracorticali GABA-ergici e un'attività ipometabolica del cervello [Blazhenets G et al, J Nucl Med, 2021]), malessere cronico, affaticamento, disturbi del sonno, ageusia e anosmia, disturbo da stress post traumatico (Post Traumatic Stress Disorder, PTSD), compromissione cognitiva e persino ictus [Davis HE et al, EClinicalMedicine, 2021].

L'infiammazione del nervo trigemino o delle radici nervose dopo il COVID-19 è stata proposta come meccanismo coinvolto nell'insorgenza di cefalea e nel dolore generalizzato [Su S et al, Brain Behav Immun, 2020].

Per quanto riguarda l'anosmia e l'ageusia, è stato sottolineato il ruolo dell'invasione virale neuroepiteliale e della successiva infiammazione come possibile meccanismo che contribuisce all'insorgenza dei disturbi [Gasmi A et al, Mol Neurobiol, 2021]. Attraverso la valutazione istologica, è stata dimostrata un'infiammazione persistente all'interno del neuroepitelio olfattivo dovuta alla persistenza virale [de Melo GD et al, Sci Transl Med, 2021]. Analogamente, biopsie hanno dimostrato la persistenza del SARS-CoV-2 nelle cellule delle papille gustative della lingua [Doyle ME et al, Am J Pathol, 2021].

Piuttosto comuni, nei pazienti nel post COVID, sono i problemi di salute mentale come ansia e depressione. Le manifestazioni neuropsichiatriche includono alterazione dello stato mentale oltre a sintomi psichiatrici multipli derivanti da encefalopatia o encefalite [Moriguchi T et al, Int J Infect Dis, 2020]. È stato, tuttavia, dimostrato che le condizioni di salute mentale, come ansia e depressione, sono tornate alla normalità nel corso del tempo, ma l'aumento del rischio di deterioramento cognitivo (brain fog), convulsioni,

demenza, psicosi e altre condizioni neurocognitive è persistito [Taquet M et al, Lancet Psychiatry, 2022].

Sindrome da Fatica cronica (Chronic Fatigue Syndrome, CFS) o Encefalomielite mialgica (ME): ME/CFS

La ME/CFS è una malattia neuroimmunitaria multisistemica con esordio spesso a seguito di un'infezione virale o batterica [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023].

In generale come definizione univoca proposta per descrivere i sintomi riferiti dai pazienti si fa riferimento a una "sostanziale riduzione o compromissione della capacità di impegnarsi in attività lavorative, educative, sociali o personali rispetto ai livelli precedenti la malattia per almeno sei mesi". Il tutto è accompagnato da una profonda stanchezza che non viene alleviata dal riposo, insieme a malessere post sforzo, sonno non ristoratore e deterioramento cognitivo o intolleranza ortostatica.

Nei casi più gravi i pazienti affetti da ME/CFS non possono lavorare a tempo pieno o addirittura sono costretti a letto, hanno un'estrema sensibilità agli input sensoriali e dipendono da altri per l'assistenza [Bateman L et al, Mayo Clin Proc, 2021].

Esiste un'importante correlazione tra la ME/CFS e la sindrome Long-COVID: si stima che circa la metà dei pazienti con Long COVID presenti gli stessi sintomi della ME/CFS, in particolare la maggioranza dei pazienti nel post COVID riferisce malessere post sforzo, ossia il sintomo principe della ME/CFS [Bateman L et al, Mayo Clin Proc, 2021]. L'affaticamento post COVID sembra essere prevalente presente nelle donne e spesso nelle stesse pazienti è stata riscontrata anche una sintomatologia di depressione e ansia [Townsend L et al, PLoS One, 2020]. Diversi studi hanno riscontrato anomalie emodinamiche, sintomatiche e cognitive simili sia nei pazienti affetti da ME/CFS sia nei pazienti con sindrome Long-COVID [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023]. In assenza di altri motivi, se la stanchezza post virale persiste per più di sei mesi si parla di Sindrome da Fatica Cronica [Townsend L et al, PLoS One, 2020].

È stato, infatti, acclarato che il SARS-CoV-2 sia tra i patogeni responsabili dell'insorgenza della ME/CFS, oltre ad altri virus tra cui gli herpesvirus riattivati, compresi EBV, HHV-6 (herpesvirus umano 6), HHV-7 (herpesvirus umano 7) e citomegalovirus umano (CMV) [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023].

Tra le anomalie che accomunano i pazienti affetti da ME/CFS e quelli con sindrome Long-COVID si riscontrano:

- neuroinfiammazione estesa e alterazioni delle funzioni neurologiche, riduzione del flusso cerebrale, anomalie del tronco encefalico e un elevato livello di lattato ventricolare, nonché problemi alla vista e agli occhi [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023]; anomalie del sistema nervoso centrale come l'ipometabolismo cerebrale potrebbero essere coinvolte nell'insorgenza della malattia [Guedj E et al, Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2021].

- anomalie vascolari ed endoteliali, presenza di microcoaguli e piastrine iperattivate [Nunes JM et al, Pharmaceuticals (Basel), 2022];

- disfunzioni mitocondriali [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023];

- intolleranza all'esercizio fisico, con un consumo di ossigeno compromesso e una soglia anaerobica ridotta, profili metabolici anomali, tra cui un consumo alterato di acidi grassi e aminoacidi [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023].

Si fa comunque riferimento a un'eziologia di carattere multifattoriale, pertanto è probabile che siano coinvolti anche fattori psicologici e ambientali per quanto concerne la stanchezza mentale [Castanares-Zapatero D et al, Ann Med, 2022].

Coinvolgimento gastrointestinale: i sintomi gastrointestinali nel Long COVID includono nausea, dolore addominale, inappetenza, pirosi gastrica e stipsi [Meringer H et al, Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022] .

La composizione del microbiota intestinale è significativamente alterata nei pazienti con COVID-19 e la disbiosi del microbiota intestinale è anche una componente chiave della ME/CFS [König RS et al, Front Immunol, 2022]. Il persistere di sintomi respiratori e neurologici è, infatti, associato a specifici patogeni intestinali [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023].

L'espressione del recettore ACE2 rende l'esofago e gli enterociti inclini a subire danni virali diretti [Lamers MM et al, Science, 2020]. Dopo la clearance virale, lo stato iperinflammatorio precedente e lo squilibrio del microbioma possono danneggiare l'integrità e la funzione gastrointestinale [Schuijt TJ et al, Gut, 2016].

Inoltre, l'RNA del SARS-CoV-2 è presente nei campioni di feci dei pazienti con COVID-19 [Davis HE et al, Nat Rev Microbiol, 2023]. La maggior parte dei pazienti con sintomi COVID prolungati e malattia infiammatoria intestinale sette mesi dopo

l'infezione presentava una persistenza dell'antigene nella mucosa intestinale [Zollner A et al, Gastroenterology, 2022].

Coinvolgimento renale: lo stato infiammatorio cronico, persistente nel Long COVID, può attivare il sistema del complemento, contribuendo alla glomerulosclerosi focale segmentale e all'involutione glomerulare [Crook H et al, BMJ, 2021]. È stato riportato un danno renale acuto tra i pazienti COVID-19 dimessi e il 35% dei pazienti guariti presenta una riduzione della funzione renale [Koc HC et al, Int J Biol Sci, 2022]. Sebbene il danno renale acuto sia stato descritto in pazienti critici che hanno richiesto una terapia renale sostitutiva nella fase acuta del COVID-19 [Herrera-Valdés R et al, MEDICC Rev, 2020], diversi meccanismi sono stati ascritti nella malattia renale cronica progressiva. Il SARS-CoV-2 è in grado di invadere diversi tipi di cellule renali, come i podociti o le cellule del tubulo prossimale, grazie all'espressione di ACE2 sulla loro superficie [Herrera-Valdés R et al, MEDICC Rev, 2020]. Inoltre, la disfunzione endoteliale e la microangiopatia sono state proposte come meccanismi sottostanti, così come le alterazioni del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) [Herrera-Valdés R et al, MEDICC Rev, 2020; Le Stang MB et al, Front Physiol, 2021].

Coinvolgimento pancreatico: il SARS-CoV-2 può scatenare pancreatite durante la fase acuta del COVID-19. Il recettore principale del SARS-CoV-2, ACE2, è un regolatore endocrino del RAAS, mentre l'altro recettore del SARS-CoV-2, TMPRSS2, si trova nelle cellule β pancreatiche. L'infezione virale compromette direttamente le cellule che esprimono ACE2 e TMPRSS2, causando disfunzioni nel RAAS e alterando l'omeostasi metabolica a lungo termine [Liu D et al, Allergy Asthma Clin Immunol, 2013]. La tempesta citochinica della fase acuta del COVID-19 potrebbe indurre un danno epato-biliare, che potrebbe portare a sintomi cronici nel periodo successivo all'infezione [Castanares-Zapatero D et al, Ann Med, 2022].

Tuttavia, altri studi hanno suggerito meccanismi diversi, indipendenti dalla gravità della fase acuta, alcuni dei quali hanno proposto la persistenza di un'infiammazione di basso grado del tratto gastrointestinale o una disfunzione autonoma del sistema nervoso [Castanares-Zapatero D et al, Ann Med, 2022]. Uno studio ha descritto alterazioni persistenti del microbiota dopo la guarigione, caratterizzate da una sottorappresentazione di commensali noti per il loro potenziale immunomodulatore. È

stata evidenziata una correlazione tra questi disturbi e i marcatori infiammatori [Yeoh YK et al, Gut, 2021].

2.4 Monitoraggio e gestione clinica dei pazienti affetti da sindrome Long-COVID

Il monitoraggio e la gestione clinica dei pazienti affetti da sindrome Long-COVID richiedono un approccio multidisciplinare che comprende la valutazione, il trattamento sintomatico, il trattamento dei problemi sottostanti ed eventualmente la fisioterapia e il supporto psicologico [Greenhalgh T et al, BMJ, 2020]. Dopo l'infezione da SARS-CoV-2 potrebbe verificarsi un peggioramento delle comorbilità sottostanti, il che potrebbe richiedere l'ottimizzazione del trattamento [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021].

Trattandosi di una malattia nuova, le conoscenze sugli effetti a lungo termine e sulle opzioni di trattamento sono ancora in evoluzione. Anche la frequenza e la durata ideali del follow-up non sono chiaramente definite, per ora la frequenza del follow-up viene personalizzata in base al profilo clinico del paziente [Greenhalgh T et al, BMJ, 2020].

Nell'approccio clinico ai pazienti con Long COVID, un'anamnesi dettagliata e l'esame obiettivo aiutano a formulare la diagnosi nei soggetti con infezione recente da SARS-CoV-2. Nei pazienti con sintomi suggestivi di Long COVID, ma senza precedenti prove di infezione da SARS-CoV-2, la dimostrazione della positività degli anticorpi aiuta a confermare la diagnosi. Tuttavia, è noto che i livelli di anticorpi diminuiscono con il passare del tempo, mettendo in discussione la diagnosi retrospettiva di infezione recente da SARS-CoV-2 [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021]; pertanto, un test sierologico negativo non esclude un'infezione pregressa da SARS-CoV-2 [Greenhalgh T et al, BMJ, 2020].

Considerato tutto ciò, diagnosticare e monitorare il Long COVID può essere arduo. La diagnosi di Long COVID presenta diverse difficoltà. Ci sono molte variabili da considerare, come il tempo necessario per il recupero clinico che varia a seconda della gravità della malattia, inoltre eventuali comorbilità complicano la diagnosi. Una percentuale significativa di pazienti infetti da SARS-CoV-2 è asintomatica, e molti individui non sono stati sottoposti ad alcun test per confermare l'infezione da SARS-CoV-2. Se questi pazienti sviluppano più sintomi in seguito, la diagnosi è ancora più complessa [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021]. I sintomi del Long COVID, infatti, si presentano in modo eterogeneo, pertanto i pazienti devono essere

monitorati attentamente. Per sviluppare strategie di trattamento efficaci, è necessaria una valutazione globale che consideri le condizioni preesistenti e identifichi i sintomi specifici [Koc HC et al, Int J Biol Sci, 2022].

Importante è, quindi, nel caso ci si trovasse di fronte a un paziente con sospetta sindrome Long-COVID, basarsi principalmente sulla valutazione clinica che inizia con la documentazione dei sintomi preesistenti, del loro miglioramento o peggioramento, e di quelli di nuova insorgenza (**Figura 14**) [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021] .

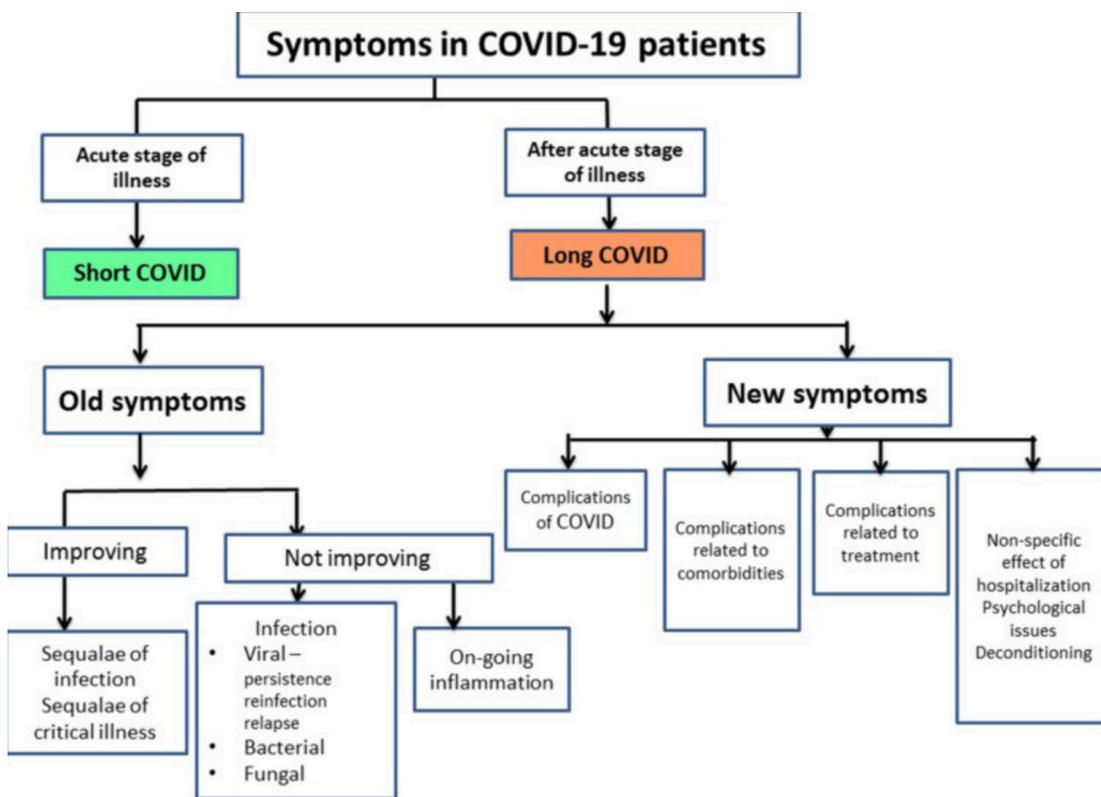


Figura 14: Approccio clinico nei pazienti con sindrome Long-COVID. Immagine tratta da un lavoro di Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021.

Il Long COVID può essere suddiviso in diverse categorie a seconda dei sintomi predominanti e residui dell’infezione acuta ad esempio “sindrome cardio-respiratoria post COVID”, nel caso persista una sintomatologia respiratoria o cardiaca, o “sindrome da affaticamento post COVID” e “sindrome neuro-psichiatrica post COVID”, nel caso prevalgano le manifestazioni neurologiche. La categorizzazione dei sintomi in base agli organi coinvolti aiuta a risalire all'eziologia e può essere utile nell’ambito della gestione clinica dei pazienti [Dasgupta A et al, J Pak Med Assoc, 2020].

Sebbene siano state pubblicate diverse linee guida sul monitoraggio dei pazienti con Long COVID, permane un'ampia lacuna nell'ambito di trattamenti specifici a livello pratico [Koc HC et al, Int J Biol Sci, 2022].

Come detto in precedenza, la pratica clinica attuale adotta un approccio basato principalmente sui sintomi nella gestione del Long COVID [Koc HC et al, Int J Biol Sci, 2022].

Oltre all'anamnesi è necessario valutare alcuni parametri tra cui l'emocromo completo, test di funzionalità renale, la valutazione della PCR, test di funzionalità epatica, la funzione tiroidea, l'emoglobina A1c (HbA1c), i livelli di vitamina D, magnesio, la vitamina B12, i folati e la ferritina. Per i pazienti che presentano sintomi cardiopolmonari, devono essere presi in considerazione esami di imaging del torace, elettrocardiografia e test di funzionalità polmonare [Koc HC et al, Int J Biol Sci, 2022].

Sono stati definiti degli indicatori clinici per guidare la diagnosi della sindrome Long-COVID:

Biochimica del siero: come illustrato in precedenza, l'infezione acuta nel COVID-19 predispone uno stato di infiammazione di basso grado che può continuare nella fase post acuta. I marcatori infiammatori sistemici sono stati proposti come biomarcatori per il Long COVID. Tra questi il D-dimero, la PCR, l'IL6, la procalcitonina e la conta dei neutrofili sono risultati associati alla persistenza dei sintomi nel periodo post COVID [Mandal S et al, Thorax, 2021].

Microbiota intestinale: come detto precedentemente, l'RNA del SARS-CoV-2 può essere rilevato in campioni fecali durante la fase acuta, indicando il coinvolgimento del tratto gastrointestinale nel COVID-19. Studi recenti rivelano che la diversità e la composizione del microbioma intestinale cambiano dopo l'infezione da COVID-19. L'aumento delle citochine in risposta dal virus può compromettere l'integrità intestinale, facilitando l'ingresso in circolo di batteri e metaboliti. Tale disbiosi scatena risposte immunitarie innate, causando disfunzioni polmonari e infezioni secondarie. Uno studio ha identificato elementi specifici del microbioma intestinale che predirebbero sintomi di Long COVID. Ad esempio, livelli elevati di *Ruminococcus*

gnavus, *Bacteroides vulgatus* e livelli ridotti di *Faecalibacterium prausnitzii* e di batteri produttori di butirrato correlerebbero con l'insorgenza del Long COVID. Questa intricata associazione può servire come strumento di rilevazione della presenza di Long COVID [Liu Q et al, Gut, 2022] .

Considerando che un numero sempre maggiore di pazienti sarà probabilmente infettato dalle varianti emergenti del SARS-CoV-2, il Long COVID continuerà a colpire una fetta sempre più grande della società nel prossimo futuro, con una sintomatologia persistente e talvolta invalidante. Pertanto è fondamentale comprenderne a fondo i fattori di rischio e attenuare i suoi potenziali impatti a lungo termine.

3. Potenziali effetti benefici dei composti naturali bioattivi nelle patologie infettive ed infiammatorie

In base a quanto esposto in precedenza, nel COVID-19 e, successivamente, nella sindrome Long-COVID, l'infiammazione cronica provoca danni multiorgano e può peggiorare le preesistenti condizioni cliniche. Pertanto, il virus resta, attualmente, una delle principali minacce per la salute pubblica.

Nonostante lo sviluppo dei vaccini, il rischio resta sempre molto elevato a causa dell'emergere di nuove varianti virali, che ci pongono davanti scenari nuovi e mutevoli, e anche a causa dell'imprevedibilità delle sequele post virali, che, come è stato visto, arrecano condizioni patologiche a lungo termine, molte delle quali sono state osservate per la prima volta. È, quindi, essenziale possedere tutti gli strumenti necessari per fronteggiare una realtà così variabile.

Attualmente, l'attenzione è rivolta alla ricerca di trattamenti e farmaci efficaci e sicuri, visti i limiti e gli effetti collaterali osservati per i farmaci sintetici somministrati finora. In questo senso, i composti naturali bioattivi, ampiamente utilizzati nell'industria farmaceutica per la loro efficacia e assenza di effetti collaterali, sono stati individuati per i loro potenziali effetti benefici nelle patologie infettive ed infiammatorie, e, quindi, sono stati testati come possibili opzioni nel trattamento del COVID-19 e la sindrome Long-COVID sia in monosomministrazione che in associazione alla terapia farmacologica [Ribeiro R et al, J Mol Model, 2023].

L'utilizzo di composti naturali bioattivi in grado di contrastare l'aumento anomalo dello stress ossidativo e dello stato infiammatorio nelle malattie croniche degenerative non trasmissibili si è rivelato utile per la gestione clinica di queste condizioni [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020] .

In alcuni studi [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020] è stata messa in luce una diminuzione significativa dei biomarcatori infiammatori tradizionali (come la PCR, la VES, il rapporto piastrine/linfociti) e di altri parametri di laboratorio come l'azotemia e l'albuminuria in pazienti affetti da malattie croniche (come la malattia renale cronica, CKD) dopo il trattamento con integratori alimentari [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020].

Per questo motivo, oltre ai farmaci tradizionali, un possibile trattamento adiuvante potrebbe essere rappresentato dai composti naturali bioattivi. L'identificazione di prodotti naturali con un notevole potenziale inibitorio nei confronti del SARS-CoV-2 potrebbe rappresentare una valida strategia per il trattamento ma anche per la prevenzione della malattia stessa.

Riguardo il COVID-19 e la sindrome Long-COVID, uno studio pilota ha dimostrato che gli integratori multivitaminici, grazie alle loro componenti antinfiammatorie e antiossidanti, migliorino i sintomi clinici nei pazienti affetti da Long COVID. Inoltre, un integratore commerciale a base di estratti vegetali di *Panax ginseng* e *Eleutherococcus senticosus* ha alleviato efficacemente l'affaticamento post COVID e migliorato lo stato di salute generale [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021]. La *nicotinamide ribosio*, una forma di vitamina B3, viene esaminata per i suoi effetti di miglioramento delle disfunzioni cognitive e della fatica cronica. Anche gli acidi grassi essenziali, come gli omega-3 (acido eicosatetraenoico - EPA + acido docosaesaenoico - DHA), sono oggetto di studio [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021].

I pazienti affetti da Long COVID presentano spesso un'ossidazione lipidica disfunzionale e un accumulo di lattato durante lo stato di attività fisica, il che indica una funzione mitocondriale compromessa. La disfunzione mitocondriale nel Long COVID condivide sintomi simili a quelli osservati nella ME/CFS. È stato riscontrato che l'integrazione con il coenzima Q10 (CoQ10) riduce la frequenza dell'affaticamento e allevia lo stress ossidativo nei pazienti affetti da ME/CFS [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021].

I flavonoidi naturali, come la luteolina e la quercetina, sono promettenti agenti immunomodulatori che hanno mostrato effetti inibitori sui mastociti [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021].

L'*echinacea-angustifolia* (EA), è una pianta comunemente utilizzata per prevenire le infezioni delle vie respiratorie superiori ed è nota per le sue proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie. Tra i suoi principali composti naturali si ritrovano flavonoidi, polifenoli, polieni, polisaccaridi e glicoproteine ad attività immunostimolante [Bharadwaj S et al, Viruses, 2021].

È stato riportato che l'EA esercita un'attività antibatterica ad ampio spettro per diversi batteri Gram-positivi e Gram-negativi come *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermidis*. È interessante notare che l'attività antivirale di EA è ben nota contro diversi virus come l'HSV, il virus dell'influenza e il rhinovirus [Bharadwaj S et al, Viruses, 2021].

Le piante del genere Echinacea sono anche note per la loro potenziale attività antivirale contro i coronavirus. In uno studio è stata dimostrata l'efficacia dell'EA come potente antagonista di una proteina virale del SARS-CoV-2 [Bharadwaj S et al, Viruses, 2021].

La sequenza del genoma a RNA del SARS-CoV-2 codifica una grande poliproteina. In seguito, la poliproteina viene divisa in 4 proteine strutturali, la proteina S, l'involucro E, la membrana M e il nucleocapside N, oltre a 16 proteine non strutturate (nsp1-nsp16) e 8 proteine accessorie. Ogni proteina del SARS-CoV-2 ha funzioni specifiche nel ciclo di replicazione virale. La proteina virale nsp5, definita anche proteinasi 3C-like (3CLpro) o proteasi principale (Mpro), è fondamentale per la trasformazione delle poliproteine in proteine funzionali. Pertanto, è stata riconosciuta come un importante bersaglio anti-SARS-CoV-2 a causa del suo ruolo essenziale nella replicazione virale. Infatti l'inibizione dell'attività di Mpro potrebbe bloccare o compromettere la replicazione virale [Bharadwaj S et al, Viruses, 2021].

Le componenti naturali dell'EA sembrerebbero avere un forte potenziale terapeutico contro il SARS-CoV-2 poiché andrebbero ad inibire proprio la proteina Mpro [Bharadwaj S et al, Viruses, 2021].

Lo studio dei composti naturali contenuti nei frutti di *Rosa canina* L. è di interesse attuale, poiché è stato riportato che tali frutti grazie all'elevato contenuto di acido ascorbico, fenoli e flavonoidi, abbiano effetti antiossidanti, antimutageni e anticancerogeni [Roman I et al, Chem Cent J, 2013].

La *Rosa canina* L. contiene diversi composti biologicamente attivi, come: zuccheri, acidi organici, pectine, flavonoidi, carotenoidi, acidi grassi, vitamine (in particolare la vitamina C e anche le vitamine B1, B2, K, PP, E). È stato riscontrato che il contenuto di vitamina C della rosa canina supera di gran lunga quello degli agrumi (30-1300 mg/100 g) [Roman I et al, Chem Cent J, 2013].

La *Rosa canina* L. è nota per il suo elevato contenuto di fenoli. Questi composti sono noti per i loro effetti antiossidanti e anticancerogeni. I composti polifenolici sono

potenziali sostanze antiossidanti e agenti protettivi contro lo sviluppo di malattie croniche [Roman I et al, Chem Cent J, 2013].

Studi recenti hanno rivelato che gli estratti di *Rosa canina* L. siano efficaci anche nell'inibizione della crescita e della formazione di biofilm nello *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) [Quave CL et al, J Ethnopharmacol, 2008].

I suoi semi sono ricchi di olio e sostanze minerali. Gli acidi grassi dell'olio di rosa canina sono principalmente: acido linoleico, oleico, linolenico, palmitico, stearico e arachidonico [Roman I et al, Chem Cent J, 2013].

La propoli è un prodotto resinoso che le api raccolgono dagli essudati delle piante, mescolati a secrezioni salivari ed enzimatiche, per proteggere e mantenere l'omeostasi dell'alveare [Lesmana R et al, Front Pharmacol, 2022]. La parola propoli deriva dal greco in cui il morfema 'Pro' significa "davanti a" o "all'ingresso di" e 'polis' significa "comunità" o "città": e infatti si tratta di una sostanza prodotta a difesa dell'alveare [Anjum SI et al, Saudi J Biol Sci, 2019].

Tra le sue innumerevoli proprietà si annoverano quelle antibatteriche, antinfiammatorie, antivirali, antiossidanti, antifungine, antisettiche e immunomodulatrici [Lesmana R et al, Front Pharmacol, 2022]. Infatti, nella propoli, sono stati identificati più di 300 composti naturali bioattivi, tra cui polifenoli (flavonoidi, acidi fenolici ed esteri), acidi aromatici, aldeidi e chetoni fenolici, oli essenziali, cere e aminoacidi [Anjum SI et al, Saudi J Biol Sci, 2019].

Proprietà antibatteriche: la propoli ha un effetto significativo contro batteri come *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. È emerso, inoltre, che gli estratti etanolic di propoli siano più efficaci contro i batteri gram-positivi e mostrano un effetto limitato contro i batteri gram-negativi, ma bloccano la crescita dei batteri gram-negativi solo a causa dell'elevata concentrazione di propoli. La modalità d'azione della propoli è dovuta all'interazione tra i fenoli e altri composti come la pinocembrina, la galangina e la pinobanksina. Allo stesso modo, l'attività antibatterica è dovuta ai suoi composti attivi, come i composti aromatici (acido caffeico) e i flavonoidi. Inoltre, la propoli agisce come agente battericida, interrompendo la divisione della cellula batterica, distruggendo la parete cellulare, il citoplasma batterico e bloccando la sintesi proteica [Anjum SI et al, Saudi J Biol Sci, 2019].

Proprietà antinfiammatorie: la propoli possiede una capacità antinfiammatoria dovuta alla presenza di flavonoidi. Controlla la NADPH-ossidasi ornitina decarbossilasi, l'attività della mieloperossidasi, la ialuronidasi dei mastociti e la tirosina-protein chinasi.

La modalità d'azione di questi composti è quella di frenare la produzione di leucotrieni e prostaglandine da parte dei globuli bianchi e di ritardare l'attività della mieloperossidasi, dell'ornitina decarbossilasi, della tirosina-protein-chinasi e della NADPH-ossidasi [Lesmana R et al, Front Pharmacol, 2022; Anjum SI et al, Saudi J Biol Sci, 2019].

Proprietà antiossidanti: è stato dimostrato che la propoli abbia proprietà antiossidanti grazie ai flavonoidi galangina e pinocembrina. Gli antiossidanti svolgono un'azione protettiva contro il danno biologico prodotto dai radicali liberi e impediscono la distruzione o l'ossidazione di vitamina C, lipidi e altri composti.

I radicali liberi sono la causa principale dell'invecchiamento delle cellule e del loro deterioramento in patologie come il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer, l'artrite, il cancro, il diabete mellito e le malattie cardiovascolari.

Componenti della propoli, come la vanillina e gli acidi fenolici, hanno la capacità di penetrare nell'epidermide e nel derma e di proteggerli dai radicali liberi. Il meccanismo della proprietà antiossidante della propoli è dovuto ai composti fenolici che donano ioni idrogeno ai radicali liberi per proteggere le cellule dalle reazioni di ossidazione [Lesmana R et al, Front Pharmacol, 2022; Anjum SI et al, Saudi J Biol Sci, 2019].

Proprietà antivirali: è noto che la propoli abbia mostrato un'attività antivirale inibendo l'ingresso del virus nelle cellule e impedendo la replicazione virale. Essa ha mostrato proprietà antivirali contro l'infezione da HSV. I flavonoidi, che includono kaempferolo, acacetina, quercetina, galangina e crisina, sono stati segnalati come citotossici [Anjum SI et al, Saudi J Biol Sci, 2019].

La pappa reale è una sostanza secreta dalle ghiandole ipofaringee e mandibolari delle api e rappresenta un importante nutraceutico, un alimento funzionale nonché un integratore alimentare [Botezan S et al, Molecules, 2023].

Anche la pappa reale possiede numerosi composti bioattivi, che includono: polifenoli, vitamine, le principali proteine della pappa reale (MRJP), l'acido 10-idrossi-2-decenoico (10-HDA) e gli ormoni.

Questi componenti biologicamente attivi sono ritenuti responsabili delle proprietà benefiche della pappa reale, singolarmente o in sinergia. Tra gli altri effetti, la pappa reale possiede effetti antitumorali, antinfiammatori e antiossidanti (*figura 15*), antimicrobici, antibatterici, immunoregolatori e antidiabetici. Inoltre, migliora la salute riproduttiva (grazie alla sua attività estrogeno-simile, e contiene testosterone, quindi può essere benefica anche per gli uomini), la guarigione delle ferite, contrastata l'invecchiamento cellulare ed ha un'azione antilipidemica e antipertensiva. È stato, inoltre, dimostrata la sua attività neuromodulatrice, promotrice della crescita cellulare (su cellule normali e sane), infine è stato osservato che abbia anche effetti positivi sulla memoria [Botezan S et al, Molecules, 2023].

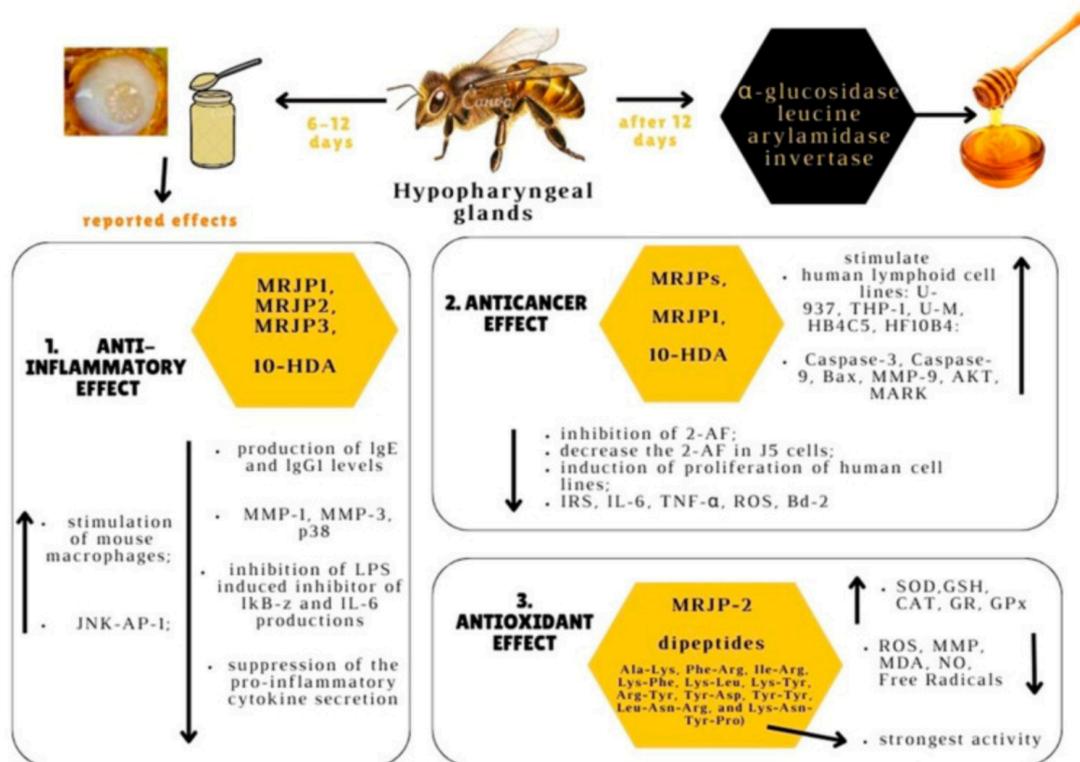


Figura 15: Effetti antitumorali, antinfiammatori e antiossidanti della pappa reale e loro meccanismi.

1. Effetti antinfiammatori: aumento della proteina-1 attivante la c-Jun N-terminal kinases (JNK-AP-1) e della stimolazione dei macrofagi di topo; inibizione della produzione di inibitore della kappa-B-zeta (I κ B-z) e di IL6 indotta dal lipopolisaccaride (LPS), inibizione della produzione di IgE (immunoglobulina E) e dei

livelli di immunoglobulina IgG1, inibizione delle attività di MMP-1 (metallopeptidasi di matrice-1), MMP-3 (metallopeptidasi di matrice-3), p38.

2. Effetti antitumorali: stimolazione della crescita delle seguenti linee cellulari linfoidi umane: U-937, THP-1, U-M, HB4C5, HF10B4; aumento dell'attività di MMP-9 (metallopeptidasi di matrice-9), AKT (proteina chinasi B) e MAPK (proteina chinasi attivata dal mitogeno); inibizione del metabolismo dei metaboliti del 2-aminofluorene (2-AF) in una linea cellulare di tumore epatico umano e diminuzione del 2-AF nelle cellule J5; induzione della proliferazione di linee cellulari umane; diminuzione dell'attività dell'IRS (insulin receptor substrate 1); IL-4 (interleuchina-4); TNF α ; ROS.

3. Effetti antiossidanti: aumento delle attività di SOD (superossido dismutasi), GSH (glutathione); CAT (catalasi); GR (glutathione reduttasi), GPx (glutathione perossidasi); diminuzione dei livelli di ROS; MMP (metallopeptidasi di matrice), MDA (malondialdeide), NO (ossido nitrico) e radicali liberi.

Immagine tratta da un lavoro di Botezan S et al, Molecules, 2023.

Lo zinco agisce come modulatore della risposta immunitaria in base alla sua biodisponibilità, che è strettamente regolata da diversi trasportatori e regolatori. Quando questo meccanismo è alterato, la biodisponibilità dello zinco si riduce e ciò impatta sulla sopravvivenza, sulla proliferazione e sulla differenziazione delle cellule di diversi organi e sistemi e, in particolare, delle cellule del sistema immunitario. La carenza di Zinco influisce sulle cellule coinvolte nell'immunità innata e adattativa a livello di sopravvivenza, proliferazione e maturazione. Queste cellule includono i monociti, i polimorfonucleati, le NK e i linfociti T e B. Le funzioni delle cellule T e l'equilibrio tra le diverse sottopopolazioni di cellule T helper sono particolarmente sensibili alle variazioni dello stato dello zinco. Mentre la carenza acuta di zinco causa una diminuzione dell'immunità innata e adattativa, la carenza cronica stimola l'infiammazione tramite l'aumento di citochine pro-infiammatorie [Bonaventura P et al, Autoimmun Rev, 2015].

Uno studio [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020] ha dimostrato che i livelli di zinco siano inversamente correlati alla concentrazione di citochine pro-infiammatorie, come IL6, IL8 e TNF α . Pertanto, studi sperimentali hanno dimostrato che la somministrazione di integratori alimentari a base di zinco determini una sostanziale

riduzione dei biomarcatori infiammatori, avvalorando così l'ipotesi dell'azione antinfiammatoria dello zinco [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020].

Secondo un recente e interessante studio [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2021], condotto sui pazienti COVID positivi asintomatici o paucisintomatici, la palmitoiletanolamide (PEA) sembra avere effetti benefici. La PEA è un'ammide di acido grasso endogeno della famiglia delle N-aciletanolammine, prodotta naturalmente nell'organismo e ampiamente presente in diverse fonti alimentari (come latte vaccino, latte materno, legumi, lecitina di soia, patate, uova). Il contenuto alimentare di PEA varia da 950.000 ng-g-1 nella lecitina di soia a 0,25 ng-g-1 nel latte vaccino.

La Food and Drug Administration ha autorizzato uno studio clinico in corso con la PEA ultramicronizzata (um) come terapia aggiuntiva nel trattamento dell'infezione della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2). A sostegno di questa ipotesi, studi *in vitro* e *in vivo* hanno evidenziato gli effetti immunomodulatori, antinfiammatori, neuroprotettivi e antidolorifici della PEA, soprattutto nella sua forma um, che mostra una migliore biodisponibilità rispetto alla sua forma originaria, con una maggiore efficacia [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2021].

Allo stato attuale delle conoscenze, la PEA è considerata dalla comunità scientifica internazionale un integratore alimentare con proprietà immunomodulanti, antinfiammatorie, neuroprotettive e antidolorifiche, oltre a contrastare il dolore cronico [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2021] .

Ulteriori composti naturali bioattivi sono stati esaminati, per i loro effetti neuroprotettivi, volti a modulare le risposte infiammatorie e quindi utilizzati nel contesto della prevenzione e del trattamento delle malattie neurodegenerative [Panaro MA et al, Nutrients, 2022].

Tra questi, i flavonoidi sono noti per modulare le risposte infiammatorie nell'ambito della neuroinfiammazione:

la miricetina, un flavonoide identificato per la prima volta nelle piante di Myricaceae circa 2 secoli fa, potrebbe essere un importante inibitore nello sviluppo della neurodegenerazione cerebrale post ischemica grazie alle sue proprietà pleiotropiche, tra cui quelle anti-amiloide, anti-fosforilazione della proteina tau e proprietà

antinfiammatorie e antiossidanti; inoltre riesce ad attraversare efficacemente la barriera ematoencefalica [Panaro MA et al, Nutrients, 2022].

la quercetina è stata descritta per le sue molteplici applicazioni farmacologiche, tra cui l'attività antinfiammatoria, antitumorale, antiapoptotica e per le sue capacità neuroprotettive, agendo sulle risposte funzionali delle cellule della microglia con diversi meccanismi, preservando l'integrità della barriera ematoencefalica. La capacità della quercetina di influenzare l'espressione dei microRNA rappresenta un aspetto interessante nella regolazione dell'infiammazione e delle risposte immunitarie [Panaro MA et al, Nutrients, 2022].

La **lattoferrina** (LF) è una glicoproteina multifunzionale che lega il ferro, appartenente alla famiglia delle transferrine, contenuta in varie cellule, tra cui neuroni e microglia. Oltre a fungere da veicolo, la LF possiede effetti protettivi in condizioni neuropatologiche. Nell'Alzheimer, l'espressione di LF aumenta significativamente nei neuroni corticali ed è presente nei depositi di amiloide. Inoltre la LF è aumentata nei neuroni dopaminergici sopravvissuti nella substantia nigra pars compacta nei pazienti affetti da malattia di Parkinson.

Se da un lato l'accumulo di LF nel cervello dei pazienti con queste patologie può essere la conseguenza di una disregolazione dell'omeostasi del ferro, dall'altro si potrebbe ipotizzare che la LF nel cervello possa contrastare i processi neurodegenerativi, svolgendo così un ruolo protettivo [Panaro MA et al, Nutrients, 2022].

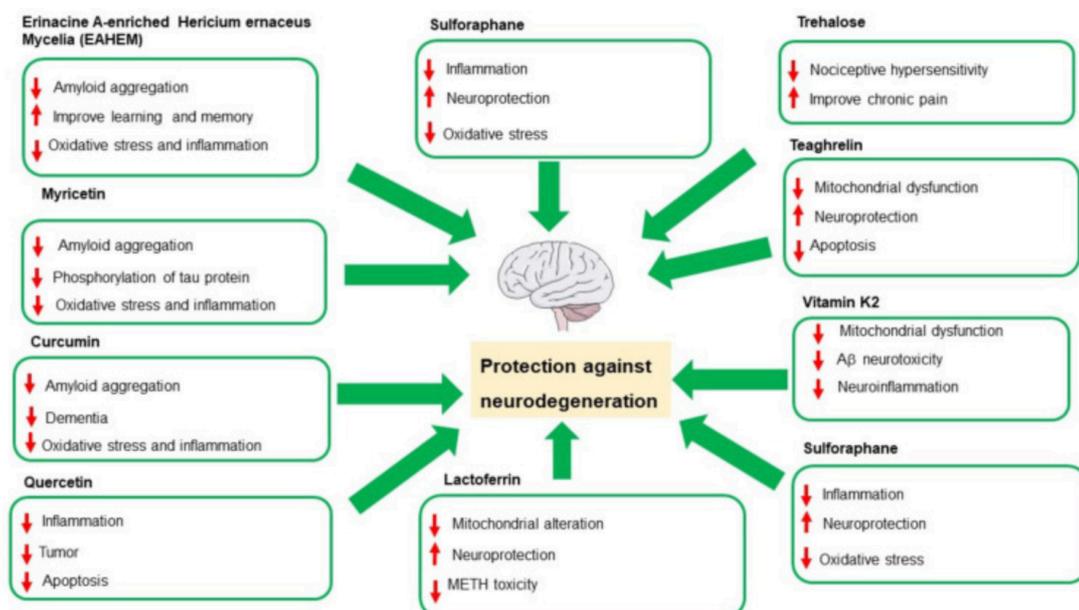


Figura 16: *Potenziali effetti neuroprotettivi di alcuni composti naturali bioattivi.*
Immagine tratta da un lavoro di Panaro MA et al, Nutrients, 2022.

II. PARTE SPERIMENTALE

1. Obiettivo dello studio

Lo studio si propone di valutare i possibili effetti benefici fisiologici dell'integratore naturale "Siuper" in una popolazione di pazienti in fase di remissione da COVID-19. Attualmente sono in corso diversi studi basati sulla valutazione dei possibili effetti benefici indotti da composti naturali bioattivi ad azione antinfiammatoria, antiossidante e immunomodulante che potrebbero potenzialmente migliorare la condizione clinica nota come "sindrome Long-COVID".

Alla luce di quanto esposto, abbiamo valutato i possibili benefici indotti dall'assunzione dell'integratore naturale "Siuper" sullo stato infiammatorio monitorando i tradizionali biomarcatori come la proteina C reattiva (PCR), la velocità di eritrosedimentazione (VES), e indicatori innovativi come il rapporto neutrofilo/linfociti (NLR), il rapporto piastrine/linfociti (PLR), il rapporto monociti/linfociti (MLR) e il rapporto linfociti/monociti (LMR), correlati allo stato infiammatorio e protrombotico. È stata, inoltre, valutata la composizione corporea e il possibile impatto dell'integratore sulla percezione della qualità della vita, mediante il questionario SF-36 (Short Form Health Survey 36).

2. Pazienti e Metodi

Caratterizzazione dell'integratore alimentare

L'integratore somministrato nello studio è stato inizialmente caratterizzato *in vitro* mediante curve di calibrazione, e i risultati di tale analisi sono stati espressi in equivalenti di acido gallico mg/g (GAE).

L'attività antiossidante *in vitro* mostra la presenza di polifenoli e composti polari minori. Il contenuto totale di fenoli e polifenoli nel Siuper, calcolato mediante saggi di reazione di trasferimento degli elettroni, era di 1,93 mg/g GAE mentre il contenuto di vitamina C, ottenuto mediante analisi HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector) era pari a 39,34 mg/g (pari a 15,74 mg/capsula).

Le informazioni relative alla composizione dell'integratore naturale Siuper sono illustrate in **Figura 17**:

INFORMAZIONI NUTRIZIONALI	Per dose giornaliera (2 capsule)	%VNR/2 capsule
- Zinco	9 mg	90 %
- Echinacea angustifolia e.s. tit. min 4% echinacoside	30 mg	
- Rosa Canina e.s. tit. min. 10% Vitamina C	20 mg 14 mg	17,5 %
90 %- Propoli polvere criomacinata tit. min. 12,15% in flavonoidi totali galangina	5.56 mg	
Pappa Reale liofilizza	40 mg	

%VNR = percentuale del valore nutritivo di riferimento (Reg. UE n. 1169/2011)

Figura 17: informazioni relative alla composizione dell'integratore naturale Siuper.

Popolazione oggetto di studio

La popolazione oggetto di studio è stata costituita da un totale di 33 pazienti che hanno contratto il COVID-19 da 1 a 6 mesi antecedenti l'inizio dello studio, come confermato dalla negatività del tampone naso-faringeo molecolare per SARS-CoV-2.

I pazienti sono stati suddivisi, mediante randomizzazione a blocchi completi, in due sottogruppi omogenei (gruppo A e gruppo B) e sottoposti a trattamento incrociato in doppio cieco (principio attivo vs placebo e viceversa).

La posologia dell'integratore era di 2cp/die per 2 mesi di trattamento (Siuper o placebo). L'integratore e il placebo sono stati forniti gratuitamente per tutta la durata dello studio.

I criteri di inclusione sono stati:

- ambo i sessi
- età compresa tra i 18 e i 75 anni
- BMI compreso tra 18,5 e 25 kg/m²
- pazienti con pregressa infezione da COVID-19 in fase di remissione, come confermato dalla negatività del tampone naso-faringeo molecolare per SARS-CoV-2 da 1 a 6 mesi.

I criteri di esclusione sono stati:

- gravidanza e allattamento
- soggetti con neoplasie in fase attiva sia solide che ematologiche
- soggetti affetti da HIV, HbsAg+ HCV+
- non accettazione del consenso informato
- eventuali allergie ai composti naturali dell'integratore
- assunzione di integratori alimentari a carattere antinfiammatorio e antiossidante negli ultimi 2 mesi.

I pazienti sono stati arruolati presso l'UOSD di Nefrologia e Dialisi, Dipartimento di Scienze Mediche del Policlinico Tor Vergata di Roma.

Tutti i pazienti arruolati hanno firmato il consenso informato, prima di essere sottoposti alla raccolta dei dati.

Il protocollo sperimentale era conforme alle linee guida del 1975 della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico Indipendente del Policlinico Universitario Tor Vergata di Roma.

La popolazione oggetto di studio è stata suddivisa in due sottogruppi, come riportato in **Figura 18**.

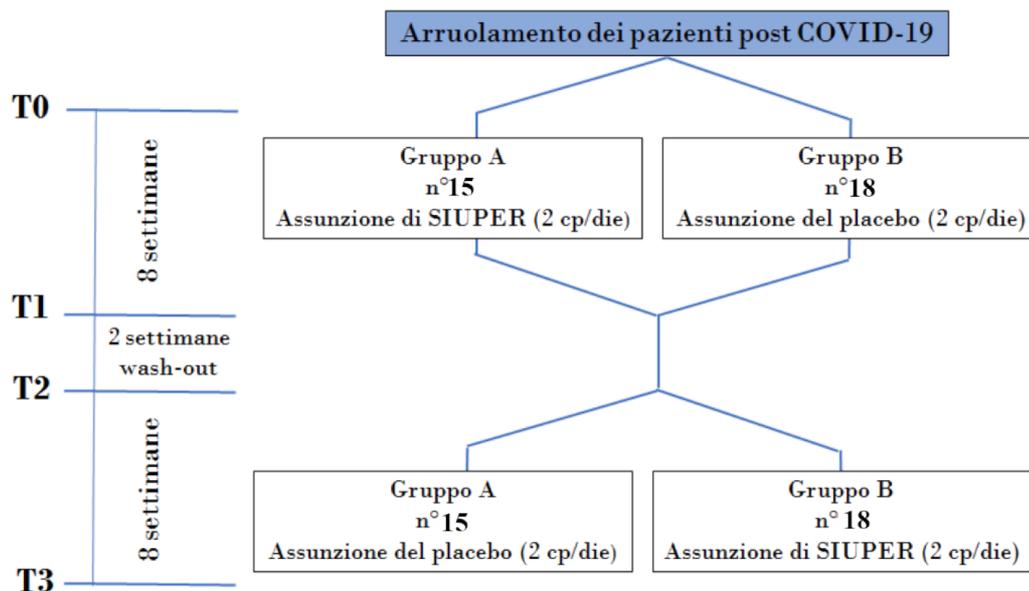


Figura 18: Flow-chart e tempi dello studio.

Lo studio è stato distinto in 4 tempi:

T0: tempo di arruolamento;

T1: dopo 8 settimane dall'inizio dello studio, ossia dopo i primi 2 mesi di trattamento con l'integratore oppure con il placebo;

T2: dopo il successivo periodo di wash-out di due settimane, ossia alla decima settimana dall'inizio dello studio;

T3: dopo ulteriori 2 mesi dalla fase di wash-out, ossia alla fine della 18esima settimana dall'inizio dello studio.

Allo scopo di rendere i due gruppi omogenei per le abitudini alimentari, prima della fase di randomizzazione, i pazienti sono stati sottoposti al questionario Prevention con Dieta Mediterranea (PREDIMED).

Al momento dell'arruolamento (T0) tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un'anamnesi patologica prossima e remota accurata, in cui sono state raccolte informazioni riguardanti l'eventuale terapia farmacologica quotidiana assunta dal paziente.

In tutti i tempi dello studio (T0, T1, T2, T3) sono stati eseguiti esami laboratoristici mediante la raccolta di un campione ematico, ottenuto da sangue venoso periferico, e mediante la raccolta di un campione di urine. Nel dettaglio sono stati eseguiti: emocromo completo con relativo calcolo degli indici infiammatori (rapporto

neutrofili/linfociti (NLR), rapporto piastrine/linfociti (PLR), rapporto monociti/linfociti (MLR) e rapporto linfociti/ monociti (LMR), creatinina sierica, e-GFR (tasso di filtrazione glomerulare stimato), azotemia, parametri infiammatori quali VES e PCR, vitamina D, dosaggio sierologico del livello di anticorpi anti- SARS-CoV-2, esame urine completo e microalbuminuria.

I campioni ematici raccolti sono stati resi anonimi mediante l'assegnazione di un codice e al termine dello studio i campioni raccolti sono stati distrutti. I pazienti hanno inoltre eseguito una valutazione della composizione corporea mediante bioimpedenziometria (BIA). Sono stati infine somministrati questionari per la percezione della qualità di vita (Short-Form 36 items health Survey- SF-36).

3. Analisi Statistica

Tutti i dati sono stati inizialmente inseriti in un foglio di calcolo Excel (Microsoft, Redmond, Washington - Stati Uniti) e l'analisi è stata eseguita utilizzando il pacchetto statistico per le scienze sociali Windows, versione 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). La statistica descrittiva consisteva della media \pm deviazione standard per il parametro con distribuzioni Normali (dopo la conferma con gli istogrammi e il test di Kolgomorov-Smirnov) e della mediana e dell'intervallo (min; max) per le variabili con distribuzioni non Normali. Il test per verificare l'omogeneità dei dati anagrafico-antropometrici tra i pazienti arruolati nello studio è stato condotto con Anova one-way. Il Chi square test verrà effettuato per l'esecuzione dell'analisi statistica inferenziale ovvero per la valutazione delle possibili associazioni o dipendenze tra due variabili categoriche. Si considera statisticamente significativo un valore di $p < 0,05$.

4. Risultati

Le caratteristiche epidemiologiche della popolazione oggetto di studio sono riportate in *Tabella 1*. La popolazione, costituita da un totale di 33 pazienti, presentava un'età media di $47,6 \pm 16,05^*$ anni, un rapporto maschi/femmine di 14/19 e, inoltre, i pazienti erano omogenei per età, sesso, BMI.

Numero di pazienti	33
Sesso (maschi/femmine)	14/19
Età media (anni)	47,6 ± 16,05*

*valore espresso come media ± deviazione standard

Tabella 1: caratteristiche epidemiologiche della popolazione oggetto di studio

La **Tabella 2** riporta i parametri laboratoristici e urinari dei pazienti monitorati prima (T0) e dopo (T1) il trattamento con l'integratore Siuper; tali parametri sono stati messi a confronto con quelli rilevati prima (T0) e dopo (T1) l'assunzione del placebo.

Al termine del trattamento (T1), solo nel periodo di assunzione dell'integratore Siuper, abbiamo osservato un incremento statisticamente significativo dei valori ematici di vitamina D (27,96±10,25 mg/dl vs. 34,54 ± 12,53 mg/dl).

PARAMETRO	SIUPER			PLACEBO		
	T0	T1	p	T0	T1	p
Globuli rossi (milioni/μL)	4,60 ± 0,41	4,73 ± 0,53	n.s.	4,72 ± 0,53	4,61 ± 0,41	n.s.
Emoglobina (Hb) (g/dl)	13,94 ± 1,50	14,06 ± 1,50	n.s.	14,03 ± 1,53	14,07 ± 1,51	n.s.
Globuli bianchi (mila/ μL)	6,43 ± 1,54	6,50 ± 1,38	n.s.	6,17 ± 1,52	6,29 ± 1,51	n.s.
Piastrine (mila/ μL)	230,81 ± 56,56	231,19 ± 53,34	n.s.	236,13 ± 47,58	234,29 ± 48,46	n.s.
Neutrofili (mila/ μL)	3,74 ± 1,29	3,74 ± 1,14	n.s.	3,54 ± 1,19	3,50 ± 0,98	n.s.

Linfociti (x10³/μL)	2,06±0,61	2,12±0,72	n.s.	2,02 ± 0,56	2,19±0,06	n.s.
Monociti (mila/μL)	0,50 ± 0,18	0,48 ± 0,18	n.s.	0,47 ± 0,14	0,45 ± 0,13	n.s.
Eosinofili (mila/μL)	0,12 ± 0,10	0,13 ± 0,13	n.s.	0,11 ± 0,10	0,12 ± 0,11	n.s.
Basofili (mila/μL)	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	n.s.	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	n.s.
Vitamina D (mg/dl)	27,96±10,25	34,54±12,53	0,0005	31,20 ± 10,65	33,98±13,40	n.s.
Creatinina (mg/dl)	0,73 ± 0,16	0,76 ± 0,17	n.s.	0,76 ± 0,18	0,76 ± 0,17	n.s.
e-GFR (CKD-EPI)	103,49 ± 13,55	100,48 ± 15,27	n.s.	100,61 ± 14,94	100,92 ± 15,81	n.s.
Azotemia	32,71 ± 7,84	33,19 ± 9,17	n.s.	32,68 ± 8,43	33,48 ± 10,43	n.s.
Microalbuminuria mattutina	20,01 ± 51,53	25,96 ± 47,84	n.s.	23,14 ± 43,11	21,27 ± 52,97	n.s.

Tabella 2: esami laboratoristici e urinari effettuati nello studio con relativa significatività statistica. Valori espressi come media ± deviazione standard; n.s.= statisticamente non significativo.

Non è stato osservato un impatto statisticamente significativo del trattamento con Siuper per quanto concerne i livelli di anticorpi anti-SARS-CoV-2, come riportato in **Tabella 3**, dove sono stati riportati i valori dei livelli di anticorpi anti- SARS-CoV-2 monitorati prima (T0) e dopo (T1) il trattamento con l'integratore Siuper e prima (T0) e dopo (T1) l'assunzione del placebo.

PARAMETRO	SIUPER			PLACEBO		
	T0	T1	p	T0	T1	p
Ab anti-SARS-CoV-2 S IgG (U/ml)	10304,73 ± 10795,05	12837,32 ± 15230,70	n.s.	10466 ± 10653,86	9762, 73 ± 10771,67	n.s.

Tabella 3: livelli di anticorpi anti- SARS-CoV-2 monitorati nello studio con relativa significatività statistica. Valori espressi come media ± deviazione standard; n.s.= statisticamente non significativo.

È stato, inoltre, valutato anche l'impatto dell'integratore alimentare Siuper sul sistema immunitario e sullo stato infiammatorio (**Tabelle 4 e 5**). È interessante notare che nei pazienti è stata osservata una riduzione dei biomarcatori infiammatori esaminati, in particolare la PCR è diminuita in modo statisticamente significativo ($2,77 \pm 2,5$ mg/dl vs. $1,44 \pm 1,70$ mg/dl) dopo il trattamento con Siuper, come si evince dalla **Tabella 4** che riporta i parametri infiammatori PCR e VES monitorati prima (T0) e dopo (T1) il trattamento con Siuper e prima (T0) e dopo (T1) l'assunzione del placebo.

PARAMETRO	SIUPER			PLACEBO		
	T0	T1	p	T0	T1	p
PCR (mg/L)	$2,77 \pm 2,5$	$1,44 \pm 1,70$	0,0145	$2,15 \pm 2,40$	$1,90 \pm 2,52$	n.s.
VES (mm/h)	$14,25 \pm 13,16$	$11,35 \pm 10,93$	n.s.	$11,39 \pm 9,61$	$15,55 \pm 12,81$	n.s.

Tabella 4: parametri infiammatori PCR e VES monitorati nello studio con relativa significatività statistica. Valori espressi come media ± deviazione standard; n.s.= statisticamente non significativo.

In **Tabella 5** sono riportati gli indici infiammatori (rapporto neutrofili/linfociti (NLR), rapporto piastrine/linfociti (PLR), rapporto monociti/linfociti (MLR) e rapporto linfociti/ monociti (LMR), monitorati prima (T0) e dopo (T1) il trattamento con Siuper e prima (T0) e dopo (T1) l'assunzione del placebo. Si osserva una riduzione statisticamente significativa del rapporto neutrofili /linfociti (NLR) ($2,08 \pm 0,81$ mila/ μL vs. $1,77 \pm 1,03$ mila/ μL) e del rapporto monociti /linfociti (MLR) ($0,26 \pm 0,14$ mila/ μL vs. $0,13 \pm 0,05$ mila/ μL) dopo il periodo di trattamento con Siuper.

PARAMETRO	SIUPER			PLACEBO		
	T0	T1	p	T0	T1	p
Neutrofili/ Linfociti (NLR) (mila/ μ L)	2,08 \pm 0,81	1,77 \pm 1,03	0,0455	1,85 \pm 0,66	1,70 \pm 0,61	n.s.
Piastrine/ Linfociti (PLR) (mila/ μ L)	119,75 \pm 40,27	121,56 \pm 49,86	n.s.	121,91 \pm 21,5	116,31 \pm 39,21	n.s.
Monociti/ Linfociti (MLR) (mila/ μ L)	0,26 \pm 0,14	0,13 \pm 0,05	0,0005	0,25 \pm 0,08	0,21 \pm 0,06	n.s.
Linfociti/ Monociti (LMR) (mila/ μ L)	4,54 \pm 1,43	4,63 \pm 1,39	n.s.	4,42 \pm 1,30	5,01 \pm 1,20	n.s.

Tabella 5: indici infiammatori (rapporto neutrofili/linfociti (NLR), rapporto piastrine/linfociti (PLR), rapporto monociti/linfociti (MLR), rapporto linfociti/monociti (LMR), monitorati nello studio con relativa significatività statistica. Valori espressi come media \pm deviazione standard; n.s. = statisticamente non significativo.

In **Tabella 6** sono illustrati i parametri relativi alla composizione corporea dei pazienti, monitorati prima (T0) e dopo (T1) il trattamento con Siuper e prima (T0) e dopo (T1) l'assunzione del placebo; tutti i parametri esaminati non hanno subito variazioni statisticamente significative.

PARAMETRO	SIUPER			PLACEBO		
	T0	T1	p	T0	T1	p
Peso (Kg)	68,25 \pm 10,77	67,52 \pm 10,70	n.s.	67,29 \pm 10,85	67,80 \pm 11,10	n.s.
Statura (m)	1,67 \pm 0,09	1,67 \pm 0,09	n.s.	1,67 \pm 0,09	1,67 \pm 0,09	n.s.
BMI	24,41 \pm 3,28	24,15 \pm 3,21	n.s.	24,19 \pm 3,43	30,68 \pm 35,91	n.s.
RZ (resistenza) (ohm)	52,94 \pm 10,76	53,16 \pm 9,81	n.s.	53,64 \pm 9,31	54,3 \pm 9,89	n.s.

RX (reattanza) (ohm)	541,03 ± 109,59	535,74 ± 93,10	n.s.	545,10 ± 92,18	511 ± 123	n.s.
Ph (Angolo di fase) (°)	5,67 ± 1,00	5,76 ± 0,89	n.s.	6,1 ± 2,63	6,02 ± 0,81	n.s.
TBW (total body water) %	55,60 ± 6,00	55,91 ± 5,78	n.s.	55,5 ± 5,15	57,3 ± 6,19	n.s.
ICW (Intracellular water) %	52,25 ± 5,20	52,75 ± 4,73	n.s.	52,41 ± 3,88	54,24 ± 3,66	n.s.
ECW (Extracellular water) %	47,75 ± 5,20	47,25 ± 4,73	n.s.	47,59 ± 3,87	45,76 ± 3,66	n.s.
FM (Fat Mass) %	24,69 ± 7,83	23,69 ± 8,14	n.s.	24,41 ± 7,09	22,03 ± 8,29	n.s.
FFM (Free Fat Mass) %	75,30 ± 7,84	76,31 ± 8,14	n.s.	75,59 ± 7,09	77,97 ± 8,29	n.s.
BCM (Body Cell Mass) %	51,61 ± 5,57	52,12 ± 5,07	n.s.	51,51 ± 4,02	53,62 ± 4,10	n.s.
BCMI (Body Cell Mass Index) (Kg/m²)	9,54 ± 2,28	9,63 ± 2,02	n.s.	9,45 ± 1,74	10,12 ± 1,90	n.s.
BMR (Basal Metabolic Rate) (Kcal/die)	1532,06 ± 234,96	1539,83 ± 218,09	n.s.	1526,2 ± 205,37	1580,8 ± 210,93	n.s.

Tabella 6: parametri relativi alla composizione corporea dei pazienti con relativa significatività statistica. Valori espressi come media ± deviazione standard; n.s.= statisticamente non significativo.

La pressione arteriosa non ha mostrato variazioni statisticamente significative dopo il trattamento, come si evince dalla **Tabella 7**, che riporta i valori pressori monitorati prima (T0) e dopo (T1) il trattamento con Siuper e prima (T0) e dopo (T1) l'assunzione del placebo.

	SIUPER			PLACEBO		
PARAMETRO	T0	T1	p	T0	T1	p
PA sistolica (mmHg)	120,26 ± 14,01	114,97 ± 12,45	n.s.	119 ± 15,67	116,19 ± 13,32	n.s.
PA diastolica (mmHg)	73,16 ± 8,07	71,52 ± 7,96	n.s.	73,87 ± 9,13	73,19 ± 9,02	n.s.
Battiti (bpm)	67,90 ± 9,96	68,32 ± 9,14	n.s.	69,29 ± 11,61	66,74 ± 10,30	n.s.

Tabella 7: parametri pressori e relativa significatività statistica. Valori espressi come media ± deviazione standard; n.s. = statisticamente non significativo.

Nei **Grafici 1 e 2** sono riportati i valori percentuali dei nove domini funzionali valutati dal questionario SF-36, che è stato somministrato a ciascun gruppo di pazienti prima (T0) e dopo (T1) il trattamento con Siuper e prima (T0) e dopo (T1) l'assunzione del placebo per valutare il possibile impatto dell'integratore sulla percezione della qualità della vita. I grafici evidenziano un trend di miglioramento al termine del trattamento (T1) solo nel periodo di assunzione dell'integratore Siuper.

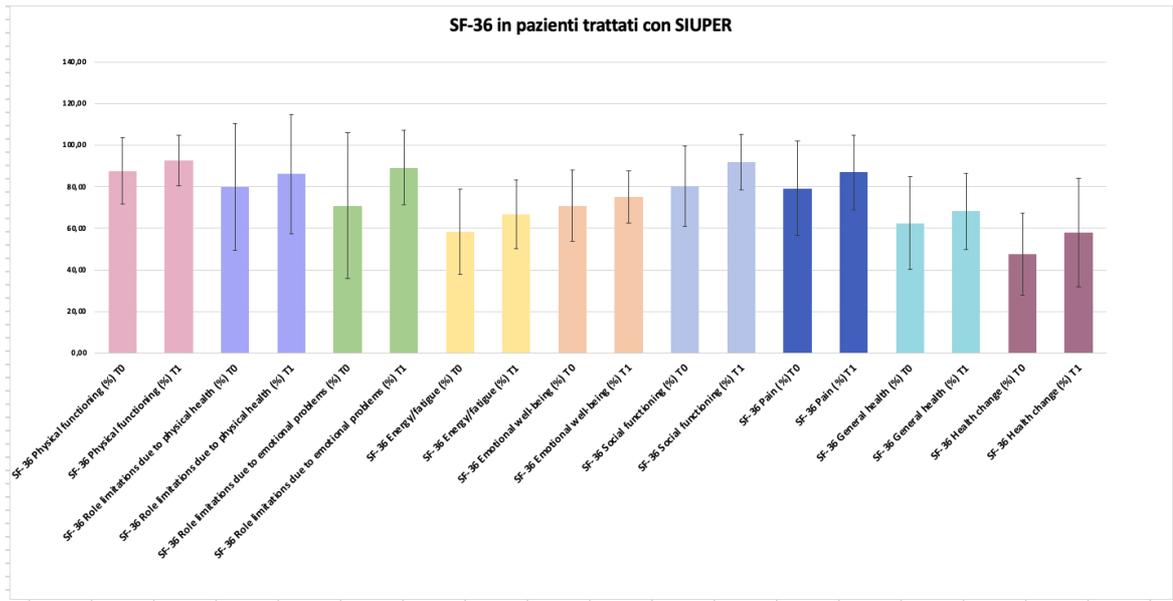


Grafico 1: valori percentuali dei nove domini funzionali valutati dal questionario SF-36 somministrato prima (T0) e dopo (T1) il trattamento con Siuper.

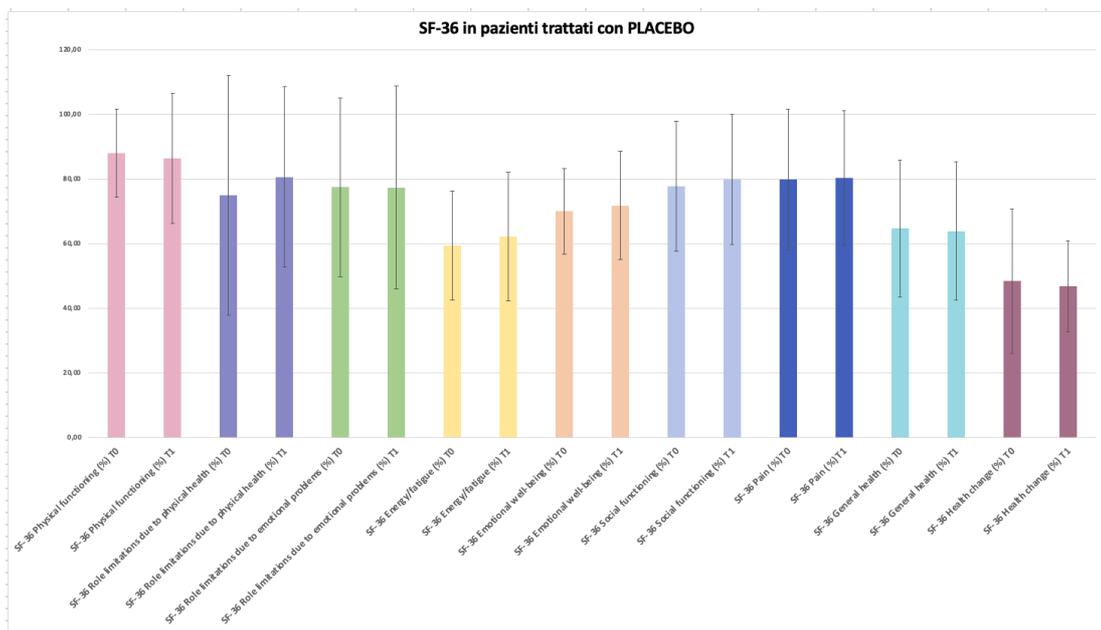


Grafico 2: valori percentuali dei nove domini funzionali valutati dal questionario SF-36 somministrato prima (T0) e dopo (T1) l'assunzione del placebo.

Nei **Grafici 3, 4, 5 e 6** sono riportati i valori percentuali dei punteggi del questionario PREDIMED, che valuta l'aderenza dei pazienti alla dieta Mediterranea; i **Grafici 3 e 4** riportano le variazioni percentuali dei punteggi del questionario PREDIMED somministrato a ciascun gruppo di pazienti prima (T0) e dopo (T1) il trattamento con Siuper, mentre i **Grafici 5 e 6** riportano le variazioni percentuali dei punteggi del questionario PREDIMED somministrato a ciascun gruppo di pazienti prima (T0) e dopo (T1) l'assunzione del placebo. Non si evidenziano variazioni statisticamente significative, azzerando in tal modo il possibile bias indotto dai cambiamenti dello stile di vita sui risultati ottenuti nel corso dello studio.

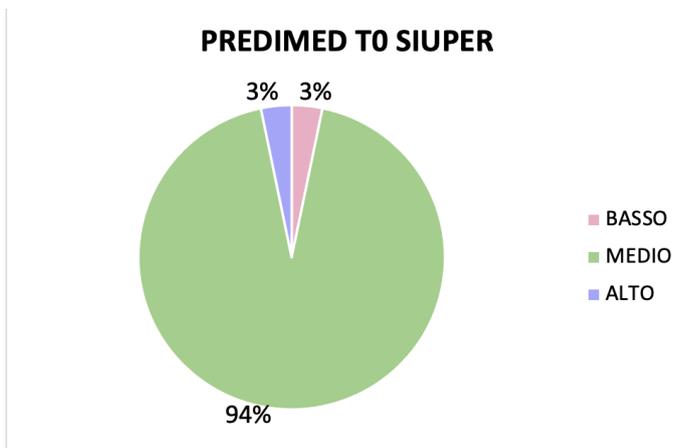


Grafico 3: variazioni percentuali dei punteggi del questionario PREDIMED somministrato prima (T0) del trattamento con Siuper.

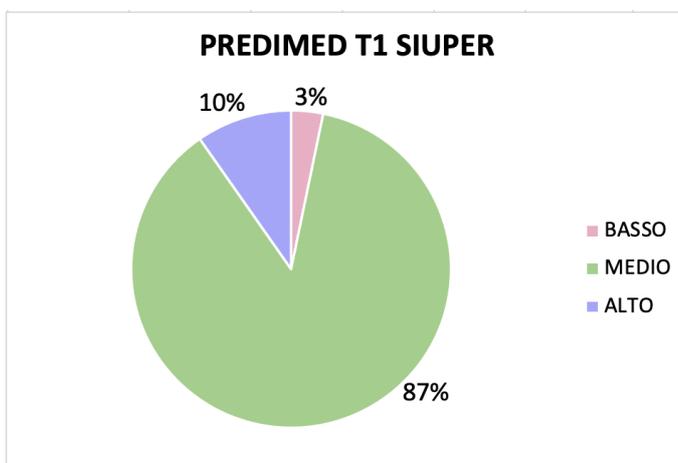


Grafico 4: variazioni percentuali dei punteggi del questionario PREDIMED somministrato dopo (T1) il trattamento con Siuper.

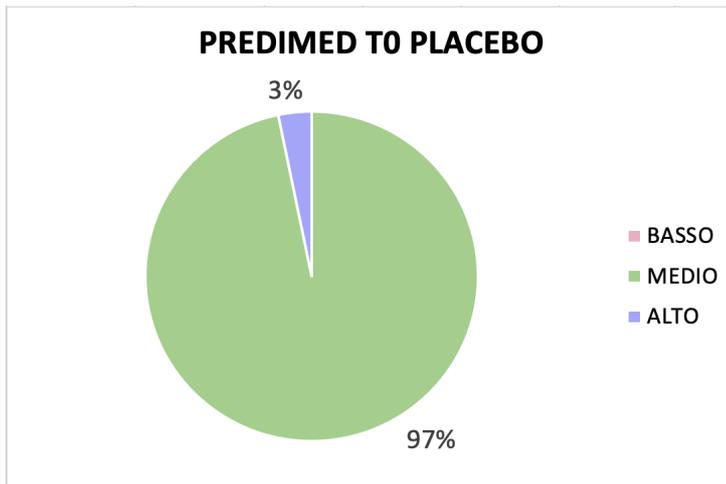


Grafico 5: variazioni percentuali dei punteggi del questionario *PREDIMED* somministrato prima (*T0*) dell'assunzione del placebo.

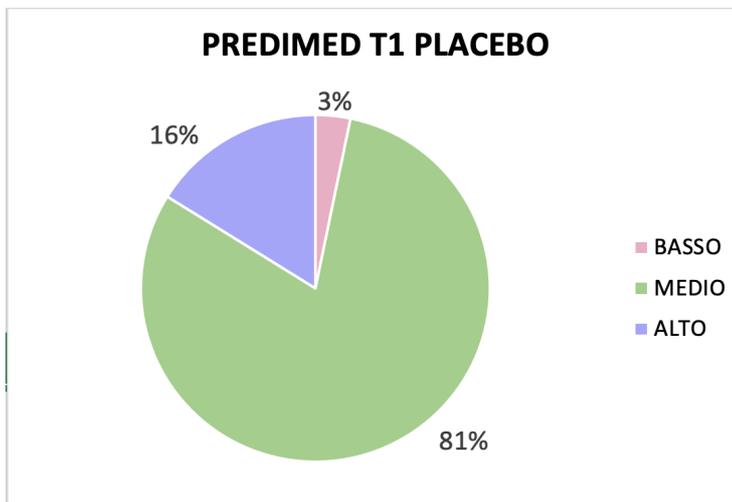


Grafico 6: variazioni percentuali dei punteggi del questionario *PREDIMED* somministrato dopo (*T1*) l'assunzione del placebo.

5. Discussione e conclusioni

Il quadro clinico dei pazienti affetti da sindrome Long-COVID riflette la persistenza di uno stato infiammatorio cronico di basso grado, che può avere un impatto multisistemico andando a compromettere il funzionamento di diversi organi e apparati con conseguente peggioramento della qualità della vita globale del paziente [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021].

L'utilizzo di composti naturali bioattivi, in grado di contrastare l'aumento anomalo dello stress ossidativo e dello stato infiammatorio nelle malattie cronico-degenerative non trasmissibili, si è rivelato essere un possibile trattamento adiuvante anche nella sindrome Long-COVID. [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020].

I dati ottenuti dal nostro studio hanno messo in luce una riduzione statisticamente significativa di alcuni biomarcatori infiammatori, quali la PCR, il rapporto neutrofili/linfociti e il rapporto monociti/linfociti, dopo l'assunzione per 8 settimane dell'integratore Siuper. Tali risultati sono in accordo con quelli di un precedente trial clinico condotto dalla Prof.ssa Noce e collaboratori, nel quale è stata riscontrata una riduzione statisticamente significativa dei biomarcatori infiammatori come la PCR e la VES in pazienti affetti da malattia renale cronica, dopo 5 settimane di trattamento con il suddetto integratore a base di composti naturali bioattivi [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020].

Il nostro studio pertanto ha confermato l'azione antinfiammatoria dell'integratore, suggerendo una possibile azione sinergica dei composti naturali bioattivi nel contrastare lo stato infiammatorio cronico di basso grado. Tale dato è corroborato anche dalla riduzione osservata dei rapporti neutrofili/linfociti, linfociti/monociti e monociti/linfociti che vengono considerati emergenti biomarcatori infiammatori, che si associano alla disfunzione endoteliale e al danno d'organo. [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020].

L'infiammazione cronica caratteristica della sindrome Long-COVID, provocata dalla persistenza del SARS-CoV-2 nei tessuti in forma latente dopo l'infezione acuta [Jacobs JLL, Med Hypotheses, 2021], può essere un meccanismo che favorisce ipercoagulabilità sistemica e la trombofilia, attraverso l'iperattivazione di fattori procoagulanti della cascata coagulativa e attraverso la formazione di microcoaguli trombotici resistenti alla fibrinolisi [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023]. Quando il SARS-CoV-2 si lega alle cellule endoteliali e alle piastrine attraverso i recettori ACE2/TMPRSS2,

promuove la disfunzione endoteliale e l'iperattivazione piastrinica, favorendo così l'attivazione della cascata coagulativa e la formazione di microcoaguli trombotici [Turner S et al, Trends Endocrinol Metab, 2023].

L'identificazione di composti naturali bioattivi ad attività antinfiammatoria e antiossidante sembrerebbe rappresentare una valida strategia per il trattamento e la prevenzione della sindrome Long-COVID. Un precedente studio pilota ha dimostrato che integratori multivitaminici, grazie alle loro azioni antinfiammatorie e antiossidanti, migliorano i sintomi clinici nei pazienti affetti da sindrome Long-COVID [Raveendran AV et al, Diabetes Metab Syndr, 2021].

Nello specifico i composti naturali costituenti l'integratore Siuper sono la rosa canina, lo zinco e l'*Echinacea angustifolia*, propoli e pappa reale. [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020]. L'*Echinacea angustifolia*, ricca di flavonoidi, polifenoli, polieni, polisaccaridi e glicoproteine ad attività immunostimolante, ha mostrato proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie. I suddetti composti naturali bioattivi sembrerebbero avere un possibile impatto contro il SARS-CoV-2 poiché sembrerebbero inibire la proteasi Mpro implicata nella replicazione virale [Bharadwaj S et al, Viruses, 2021].

La rosa canina è ricca di vitamina C e composti polifenolici, pertanto ha effetti antiossidanti e antinfiammatori [Roman I et al, Chem Cent J, 2013]. È stato riscontrato che il contenuto di vitamina C della rosa canina supera di gran lunga quello degli agrumi (30-1300 mg/100 g) [Roman I et al, Chem Cent J, 2013]. L'elevato contenuto di polifenoli e vitamina C giocherebbe un ruolo chiave nella detossinazione cellulare, in quanto entrambi i composti sono in grado di ridurre la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020].

La riduzione dei biomarcatori infiammatori osservata dopo le 8 settimane di trattamento con Siuper, può essere, inoltre, dovuta anche all'azione antinfiammatoria dello zinco. Nell'integratore alimentare da noi testato, la dose di zinco per ogni capsula è pari a 4,5 mg; pertanto, la dose giornaliera di zinco assunta è stata di 9 mg, in linea con la massima dose giornaliera tollerabile (25 mg/die) riportata nei LARN (Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia) [Noce A et al, Pharmaceuticals (Basel), 2020]. Lo zinco agisce come modulatore della risposta immunitaria. La carenza di zinco stimola l'infiammazione tramite l'aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie [Bonaventura P et al, Autoimmun Rev, 2015]. Infatti, diversi studi dimostrano che i livelli di zinco sono inversamente correlati alla

concentrazione di citochine pro-infiammatorie, come IL6, IL8 e TNF α . Inoltre, la carenza di zinco, in caso di infezioni gravi, provoca un aumento sistemico dell'attivazione di NF- κ B, fattore di trascrizione implicato nell'espressione di molti geni pro-infiammatori. Studi *in vitro* hanno dimostrato che lo zinco riduce l'attivazione di NF- κ B e dei suoi geni bersaglio, come TNF- α e IL-1 β , e aumenta l'espressione genica di A20 e PPAR- α , proteine ad azione antinfiammatoria [Jarosz M et al, *Inflammopharmacology*, 2017]. Pertanto, la somministrazione di integratori alimentari a base di zinco sembrerebbe ridurre i biomarcatori infiammatori, avvalorando così l'ipotesi della sua azione antiflogistica, come dimostrato nel nostro studio. [Noce A et al, *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020]. Importante è anche il potere antiossidante dello zinco. Quest'ultimo, infatti, ritarda i processi ossidativi a lungo termine inducendo l'espressione delle metallotioneine, proteine ricche di cisteina con alta affinità per i metalli pesanti, che agiscono come potenti "spazzini" elettrofilici e agenti citoprotettivi. Inoltre, lo zinco aumenta l'attivazione di proteine ed enzimi antiossidanti, come la glutatione e la catalasi [Jarosz M et al, *Inflammopharmacology*, 2017].

Il nostro studio ha, inoltre, messo in luce un incremento statisticamente significativo dei valori ematici della vitamina D dopo l'assunzione dell'integratore Siuper. La vitamina D influenza l'attività del sistema immunitario, modulando il processo infiammatorio. Diversi studi hanno rilevato una correlazione inversa tra i livelli di vitamina D ed i marcatori dell'infiammazione, [Cannell JJ et al, *Dermatoendocrinol*, 2015] avvalorando, così, i risultati ottenuti nel nostro studio. Oltre al suo ruolo chiave nell'omeostasi del calcio, infatti, la vitamina D svolge un ruolo importante nella modulazione del sistema immunitario e dell'infiammazione, regolando la produzione di citochine infiammatorie e inibendo la proliferazione delle cellule proinfiammatorie. Diversi studi hanno associato bassi livelli di vitamina D a un aumento del rischio di sviluppare patologie cronico-degenerative non trasmissibili e di esito sfavorevole alle infezioni acute. L'integrazione di vitamina D, pertanto, rafforza la risposta immunitaria. Per di più è di comune riscontro che pazienti affetti da patologie infiammatorie croniche presentino bassi livelli di vitamina D [Yin K et al, *J Inflamm Res*, 2014]. È sempre più rilevante, inoltre, la correlazione esistente tra la carenza di vitamina D e le patologie autoimmunitarie come la sclerosi multipla, il diabete mellito di tipo 1 e il morbo di Crohn [Hewison M, *Proc Nutr Soc*, 2012].

In conclusione, questo studio sembrerebbe confermare il ruolo benefico dell'integratore naturale Siuper nei pazienti affetti da sindrome Long-COVID. Tale

ipotesi è avvalorata dai risultati da noi ottenuti che ci hanno permesso di osservare un impatto positivo del trattamento con Siuper sullo stato infiammatorio e contestualmente un miglioramento della qualità di vita come testimoniato dal trend positivo ottenuto elaborando i risultati del questionario che valuta la percezione della qualità di vita (SF-36). Pertanto, l'integratore naturale Siuper sembra essere utile nel trattamento dello stato infiammatorio cronico nei pazienti con sindrome Long-COVID, grazie alla presenza di composti naturali bioattivi che sinergicamente sembrerebbero contrastare l'aumento anomalo dello stress ossidativo e dello stato infiammatorio.

III. LISTA ABBREVIAZIONI

10-HDA: acido 10-idrossi-2-decenoico
2-AF: 2-aminofluorene
ACE2: enzima 2 convertitore dell' angiotensina
ACS: sindrome coronarica acuta
ADAMTS13: disintegrin metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 13
AKI: insufficienza renale acuta
AKT: proteina chinasi B
ALT: alanina aminotransferasi
ARDS: sindrome da distress respiratorio acuto
AST: aspartato aminotransferasi
AT1: cellule alveolari di tipo 1
AT2: cellule alveolari di tipo 2
ATP: adenosina trifosfato
BAL: lavaggio broncoalveolare
BCM: Body Cell Mass
BCMI: Body Cell Mass Index
BEE: barriera ematoencefalica
BIA: bioelectrical impedance analysis
BMEC: cellule endoteliali microvascolari cerebrali
BMI: indice di massa corporea
BMR: Basal Metabolic Rate
CAT: catalasi
CCL2: ligando della chemochina 2
CCL3: ligando della chemochina 3
CCL7: ligando della chemochina 7
CD61: integrina beta 3
cDNA: DNA complementare
CID: coagulazione intravascolare disseminata
CKD: malattia renale cronica
CMV: Citomegalovirus
CoQ10: coenzima Q10
COVID-19: coronavirus disease
CXCL1: ligando della chemochina 1
CXCL10: ligando della chemochina 10
CXCL11: ligando della chemochina 11

CXCL12a: ligando della chemochina 12°
CXCL8: interleuchina 8
CXCL9: ligando della chemochina 9
CXR: Radiografia del torace
DHA: acido docosaesaenoico
DPI: dispositivi di protezione individuale
EA: echinacea-angustifolia
EBV: Epstein Barr virus
ECs: cellule endoteliali
eGFR: tasso di filtrazione glomerulare stimato
ECW: Extracellular water
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPA: acido eicosatetraenoico
ERGIC: compartimento intermedio del reticolo endoplasmatico-Golgi
EVs: vescicole extracellulari
FFM: Free Fat Mass
FGF2: fibroblast growth factor 2
FM: Fat Mass
FSH: ormone follicolo stimolante
FVIIa : fattore VIIa della coagulazione
GAE: equivalenti di acido gallico
GBS: Sindrome di Guillain-Barré
GCSF: granulocyte- colony stimulating factor
GFR: velocità di filtrazione glomerulare
GMCSF: granulocyte- macrophage colony- stimulating factor
GPx: glutatione perossidasi
GR: glutatione reduttasi
GSH: glutatione
Hb: emoglobina
HbA1c: emoglobina A1c
HbsAg: antigene di superficie dell'epatite B
HCV: virus dell'epatite C
HHV-6: herpesvirus umano 6
HHV-7: herpesvirus umano 7
HIV: virus dell'immunodeficienza umana
HPLC-DAD: High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector
hsCTn: troponina cardiaca ad alta sensibilità

HSV: herpes simplex virus
ICW: Intracellular water
IFN- α : interferone alpha
IFN- β : interferone beta
IFN: interferone
IFNLR-1: recettore 1 dell'interferone lambda
IFN γ : interferone gamma
IgE: immunoglobulina E
IgG: immunoglobuline G
IgM: immunoglobuline M
I κ B-z: inibitore della kappa-B-zeta
IL-10R2: subunità 2 del recettore IL-10
IL-1R1: recettore dell'interleuchina 1 di tipo 1
IL1- β : interleuchina 1- β
IL10: interleuchina 10
IL12: interleuchina 12
IL17: interleuchina 17
IL18: interleuchina 18
IL1RA: interleuchina 1 Receptor Antagonist
IL2: interleuchina 2
IL21: interleuchina 21
IL22: interleuchina 22
IL4: interleuchina 4
IL6: interleuchina 6
IL7: interleuchina 7
IL8: interleuchina 8
IL9: interleuchina 9
IP10: interferon- gamma inducible protein 10
IRS: insulin receptor substrate 1
JNK-AP-1: proteina-1 attivante la c-Jun N-terminal chinasi
LARN: Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia
LDH: lattato deidrogenasi
LF: lattoferrina
LH: ormone luteinizzante
LMR: rapporto linfociti/ monociti
LPS: lipopolisaccaride
LUS: Lung Ultrasound

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B
MAPK: proteina chinasi attivata dal mitogeno
MCAS: sindrome da attivazione dei mastociti
MCP1: monocyte chemoattractant protein-1
MDA: malondialdeide
ME/CFS: encefalomielite mialgica/sindrome da stanchezza cronica
MERS-CoV: sindrome respiratoria mediorientale da coronavirus
MERS: sindrome respiratoria mediorientale
MIP1 α : macrophage inflammatory protein-1 alpha
MIP1 β : macrophage inflammatory protein-1 beta
MLR: rapporto monociti/linfociti
MMP-1: metallopeptidasi di matrice-1
MMP-3: metallopeptidasi di matrice-3
MMP-9: metallopeptidasi di matrice-9
MMP: metallopeptidasi di matrice
MRJP: principali proteine della pappa reale
MRSA: Staphylococcus aureus meticillino-resistente
nCoV-2019: nuovo coronavirus 2019
NET: trappole extracellulari per neutrofilo
NK: cellule natural killer
NLR: rapporto neutrofilo/linfociti
NO: ossido nitrico
NRP1: neuropilina 1
NT proBNP: peptide natriuretico N- terminale di tipo pro-B
NTD: dominio N-terminale
OH: ipotensione ortostatica
OMS: Organizzazione mondiale della sanità
PCR: proteina C-reattiva
PCSK5: proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 5
PCSK7: proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 7
PDGFB: fattore di crescita derivato dalle piastrine subunità B
PEA: palmitoiletanolamide
Ph: Angolo di fase
PLR: rapporto piastrine/ linfociti
POTS: sindrome da tachicardia posturale ortostatica
PPAR- α : recettori attivati da proliferatori perossisomiali
PREDIMED: Prevenzione con Dieta Mediterranea

PS: fosfatidilserina
PT: tempo di protrombina
PTSD: Post Traumatic Stress Disorder
RAAS: sistema renina-angiotensina-aldosterone
RANTES/CCL5: ligando della chemochina 5
RBD: receptor-binding domain
ROS: specie reattive dell'ossigeno
RT-PCR: Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RX: reattanza
RZ: resistenza
S100A8: proteina legante il calcio A8
S100A9: proteina legante il calcio A9
SAA: amiloide A sierica
SARS-CoV-2: sindrome respiratoria severa acuta da coronavirus 2
SARS-CoV: sindrome respiratoria severa acuta da coronavirus
SARS: sindrome respiratoria acuta grave
SF-36 : Short Form Health Survey 36
SNC: sistema nervoso centrale
SOD: superossido dismutasi
TBW: total body water
TC: tomografia computerizzata
TF: fattore tissutale
TLR4: toll-like receptor 4
TMPRSS2: serin proteasi-2 transmembrana
TNF α : fattore di necrosi tumorale alpha
VEGFA: fattore di crescita-A dell'endotelio vascolare
VES: velocità di eritrosedimentazione
VOC: variante di preoccupazione
VOI: variante di interesse
vWF: fattore di von Willebrand

IV. BIBLIOGRAFIA

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010 Jan;37(1):13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030. Epub 2009 Aug 5. PMID: 19664713.

Afrin LB, Pöhlau D, Raithel M, Haenisch B, Dumoulin FL, Homann J, Mauer UM, Harzer S, Molderings GJ. Mast cell activation disease: An underappreciated cause of neurologic and psychiatric symptoms and diseases. *Brain Behav Immun.* 2015 Nov;50:314-321. doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.002. Epub 2015 Jul 8. PMID: 26162709.

Ahmed S, Leurent B, Sampson EL. Risk factors for incident delirium among older people in acute hospital medical units: a systematic review and meta-analysis. *Age Ageing.* 2014 May;43(3):326-33. doi: 10.1093/ageing/afu022. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24610863; PMCID: PMC4001175.

Akalin E, Azzi Y, Bartash R, Seethamraju H, Parides M, Hemmige V, Ross M, Forest S, Goldstein YD, Ajaimy M, Liriano-Ward L, Pynadath C, Loarte-Campos P, Nandigam PB, Graham J, Le M, Rocca J, Kinkhabwala M. Covid-19 and Kidney Transplantation. *N Engl J Med.* 2020 Jun 18;382(25):2475-2477. doi: 10.1056/NEJMc2011117. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32329975; PMCID: PMC7200055.

Akhmerov A, Marbán E. COVID-19 and the Heart. *Circ Res.* 2020 May 8;126(10):1443-1455. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317055. Epub 2020 Apr 7. PMID: 32252591.

Amruta N, Chastain WH, Paz M, Solch RJ, Murray-Brown IC, Befeler JB, Gressett TE, Longo MT, Engler-Chiurazzi EB, Bix G. SARS-CoV-2 mediated neuroinflammation and the impact of COVID-19 in neurological disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2021 Apr;58:1-15. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.02.002. Epub 2021 Feb 19. PMID: 33674185; PMCID: PMC7894219.

Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Bashir MA, Tahir M, Ansari MJ, Ghramh HA, Adgaba N, Dash CK. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci.* 2019 Nov;26(7):1695-1703. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.08.013. Epub 2018 Aug 17. PMID: 31762646; PMCID: PMC6864204.

Antony AR, Haneef Z. Systematic review of EEG findings in 617 patients diagnosed with COVID-19. *Seizure*. 2020 Dec;83:234-241. doi: 10.1016/j.seizure.2020.10.014. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33121875; PMCID: PMC7569418.

Apple AC, Oddi A, Peluso MJ, Asken BM, Henrich TJ, Kelly JD, Pleasure SJ, Deeks SG, Allen IE, Martin JN, Ndhlovu LC, Miller BL, Stephens ML, Hellmuth J. Risk factors and abnormal cerebrospinal fluid associate with cognitive symptoms after mild COVID-19. *Ann Clin Transl Neurol*. 2022 Feb;9(2):221-226. doi: 10.1002/acn3.51498. Epub 2022 Jan 19. PMID: 35043593; PMCID: PMC8862406.

Arnedo-Pena A, Guillen-Grima F. Incidence and Risk Factors of the COVID-19 Pandemic: An Epidemiological Approach. *Epidemiologia (Basel)*. 2023 Apr 25;4(2):134-136. doi: 10.3390/epidemiologia4020014. PMID: 37218873; PMCID: PMC10204463.

Asadi-Pooya AA, Akbari A, Emami A, Lotfi M, Rostamihosseinkhani M, Nemati H, Barzegar Z, Kabiri M, Zeraatpisheh Z, Farjoud-Kouhanjani M, Jafari A, Sasannia F, Ashrafi S, Nazeri M, Nasiri S, Shahisavandi M. Risk Factors Associated with Long COVID Syndrome: A Retrospective Study. *Iran J Med Sci*. 2021 Nov;46(6):428-436. doi: 10.30476/ijms.2021.92080.2326. PMID: 34840383; PMCID: PMC8611223.

Asfuroglu Kalkan E, Ates I. A case of subacute thyroiditis associated with Covid-19 infection. *J Endocrinol Invest*. 2020 Aug;43(8):1173-1174. doi: 10.1007/s40618-020-01316-3. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32504458; PMCID: PMC7273820.

Aung MN, Koyanagi Y, Yuasa M. Health inequality among different economies during early phase of COVID-19 pandemic. *J Egypt Public Health Assoc*. 2021 Feb 17;96(1):3. doi: 10.1186/s42506-021-00067-0. PMID: 33595767; PMCID: PMC7887563.

Bansal M. Cardiovascular disease and COVID-19. *Diabetes Metab Syndr*. 2020 May-Jun;14(3):247-250. doi: 10.1016/j.dsx.2020.03.013. Epub 2020 Mar 25. PMID: 32247212; PMCID: PMC7102662.

Bardají A, Carrasquer A, Sánchez-Giménez R, Lal-Trehan N, Del-Moral-Ronda V, Peiró ÓM, Bonet G, Castilho G, Fort-Gallifa I, Benavent C, Recio G, Gutiérrez C, Villavicencio C, Auguet T, Boqué C. Implicaciones pronósticas del daño miocárdico en pacientes con y sin diagnóstico confirmado de COVID-19 atendidos en un hospital universitario [Prognostic implications of myocardial injury in patients with and without COVID-19 infection treated

in a university hospital]. Rev Esp Cardiol. 2021 Jan;74(1):24-32. Spanish. doi: 10.1016/j.recesp.2020.08.009. Epub 2020 Sep 4. PMID: 32921872; PMCID: PMC7473008.

Bateman L, Bested AC, Bonilla HF, Chheda BV, Chu L, Curtin JM, Dempsey TT, Dimmock ME, Dowell TG, Felsenstein D, Kaufman DL, Klimas NG, Komaroff AL, Lapp CW, Levine SM, Montoya JG, Natelson BH, Peterson DL, Podell RN, Rey IR, Ruhoy IS, Vera-Nunez MA, Yellman BP. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Essentials of Diagnosis and Management. Mayo Clin Proc. 2021 Nov;96(11):2861-2878. doi: 10.1016/j.mayocp.2021.07.004. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34454716.

Becker RC. Toward understanding the 2019 Coronavirus and its impact on the heart. J Thromb Thrombolysis. 2020 Jul;50(1):33-42. doi: 10.1007/s11239-020-02107-6. PMID: 32297133; PMCID: PMC7156795.

Bergamaschi L, Mescia F, Turner L, Hanson AL, Kotagiri P, Dunmore BJ, Ruffieux H, De Sa A, Huhn O, Morgan MD, Gerber PP, Wills MR, Baker S, Calero-Nieto FJ, Doffinger R, Dougan G, Elmer A, Goodfellow IG, Gupta RK, Hosmillo M, Hunter K, Kingston N, Lehner PJ, Matheson NJ, Nicholson JK, Petrunkina AM, Richardson S, Saunders C, Thaventhiran JED, Toonen EJM, Weekes MP; Cambridge Institute of Therapeutic Immunology and Infectious Disease-National Institute of Health Research (CITIID-NIHR) COVID BioResource Collaboration; Göttgens B, Toshner M, Hess C, Bradley JR, Lyons PA, Smith KGC. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8⁺ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. Immunity. 2021 Jun 8;54(6):1257-1275.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2021.05.010. Epub 2021 May 16. PMID: 34051148; PMCID: PMC8125900.

Bharadwaj S, El-Kafrawy SA, Alandijany TA, Bajrai LH, Shah AA, Dubey A, Sahoo AK, Yadava U, Kamal MA, Azhar EI, Kang SG, Dwivedi VD. Structure-Based Identification of Natural Products as SARS-CoV-2 M^{pro} Antagonist from *Echinacea angustifolia* Using Computational Approaches. Viruses. 2021 Feb 15;13(2):305. doi: 10.3390/v13020305. PMID: 33672054; PMCID: PMC7919488.

Blake A, Collins D, O'Connor E, Bergin C, McLaughlin AM, Martin-Loeches I. Clinical and biochemical characteristics of patients admitted to ICU with SARS-CoV-2. Med Intensiva (Engl Ed). 2020 Dec;44(9):589-590. doi: 10.1016/j.medin.2020.05.003. Epub 2020 May 16. PMID: 32425288; PMCID: PMC7229922.

Blazhenets G, Schroeter N, Bormann T, Thurow J, Wagner D, Frings L, Weiller C, Meyer PT, Dressing A, Hosp JA. Slow but Evident Recovery from Neocortical Dysfunction and Cognitive Impairment in a Series of Chronic COVID-19 Patients. *J Nucl Med*. 2021 Jul 1;62(7):910-915. doi: 10.2967/jnumed.121.262128. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33789937; PMCID: PMC8882885.

Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev*. 2015 Apr;14(4):277-85. doi: 10.1016/j.autrev.2014.11.008. Epub 2014 Nov 24. PMID: 25462582.

Borzuk AC, Yantiss RK. The pathogenesis of coronavirus-19 disease. *J Biomed Sci*. 2022 Oct 26;29(1):87. doi: 10.1186/s12929-022-00872-5. PMID: 36289507; PMCID: PMC9597981.

Botezan S, Baci GM, Bagameri L, Paşca C, Dezmirean DS. Current Status of the Bioactive Properties of Royal Jelly: A Comprehensive Review with a Focus on Its Anticancer, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Effects. *Molecules*. 2023 Feb 3;28(3):1510. doi: 10.3390/molecules28031510. PMID: 36771175; PMCID: PMC9921556.

Brancatella A, Ricci D, Viola N, Sgrò D, Santini F, Latrofa F. Subacute Thyroiditis After Sars-COV-2 Infection. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Jul 1;105(7):dgaa276. doi: 10.1210/clinem/dgaa276. PMID: 32436948; PMCID: PMC7314004.

Bridwell R, Long B, Gottlieb M. Neurologic complications of COVID-19. *Am J Emerg Med*. 2020 Jul;38(7):1549.e3-1549.e7. doi: 10.1016/j.ajem.2020.05.024. Epub 2020 May 16. PMID: 32425321; PMCID: PMC7229718.

Brogna C, Brogna B, Bisaccia DR, Lauritano F, Marino G, Montano L, Cristoni S, Prisco M, Piscopo M. Could SARS-CoV-2 Have Bacteriophage Behavior or Induce the Activity of Other Bacteriophages? *Vaccines (Basel)*. 2022 Apr 29;10(5):708. doi: 10.3390/vaccines10050708. PMID: 35632464; PMCID: PMC9143435.

Bulut C, Kato Y. Epidemiology of COVID-19. *Turk J Med Sci*. 2020 Apr 21;50(SI-1):563-570. doi: 10.3906/sag-2004-172. PMID: 32299206; PMCID: PMC7195982.

Cabrera LE, Pekkarinen PT, Alander M, Nowlan KHA, Nguyen NA, Jokiranta S, Kuivanen S, Patjas A, Mero S, Pakkanen SH, Heinonen S, Kantele A, Vapalahti O, Kekäläinen E, Strandin T. Characterization of low-density granulocytes in COVID-19. *PLoS Pathog*. 2021

Jul 6;17(7):e1009721. doi: 10.1371/journal.ppat.1009721. PMID: 34228753; PMCID: PMC8284631.

Cambier S, Metzemaekers M, de Carvalho AC, Nooyens A, Jacobs C, Vanderbeke L, Malengier-Devlies B, Gouwy M, Heylen E, Meersseman P, Hermans G, Wauters E, Wilmer A; CONTAGIOUS Consortium; Schols D, Matthys P, Opdenakker G, Marques RE, Wauters J, Vandooren J, Proost P. Atypical response to bacterial coinfection and persistent neutrophilic bronchoalveolar inflammation distinguish critical COVID-19 from influenza. *JCI Insight*. 2022 Jan 11;7(1):e155055. doi: 10.1172/jci.insight.155055. PMID: 34793331; PMCID: PMC8765057.

Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, van der Meer F, Kallio K, Kaya T, Anastasina M, Smura T, Levanov L, Szirovicza L, Tobi A, Kallio-Kokko H, Österlund P, Joensuu M, Meunier FA, Butcher SJ, Winkler MS, Mollenhauer B, Helenius A, Gokce O, Teesalu T, Hepojoki J, Vapalahti O, Stadelmann C, Balistreri G, Simons M. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*. 2020 Nov 13;370(6518):856-860. doi: 10.1126/science.abd2985. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33082293; PMCID: PMC7857391.

Castanares-Zapatero D, Chalon P, Kohn L, Dauvrin M, Detollenaere J, Maertens de Noordhout C, Primus-de Jong C, Cleemput I, Van den Heede K. Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review. *Ann Med*. 2022 Dec;54(1):1473-1487. doi: 10.1080/07853890.2022.2076901. PMID: 35594336; PMCID: PMC9132392.

Chakraborty C, Sharma AR, Bhattacharya M, Agoramoorthy G, Lee SS. Evolution, Mode of Transmission, and Mutational Landscape of Newly Emerging SARS-CoV-2 Variants. *mBio*. 2021 Aug 31;12(4):e0114021. doi: 10.1128/mBio.01140-21. Epub 2021 Aug 31. PMID: 34465019; PMCID: PMC8406297.

Chan KH, Farouji I, Abu Hanoud A, Slim J. Weakness and elevated creatinine kinase as the initial presentation of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Am J Emerg Med*. 2020 Jul;38(7):1548.e1-1548.e3. doi: 10.1016/j.ajem.2020.05.015. Epub 2020 May 11. PMID: 32414522; PMCID: PMC7211689.

Chen C, Hauptert SR, Zimmermann L, Shi X, Fritsche LG, Mukherjee B. Global Prevalence of Post-Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Condition or Long COVID: A Meta-

Analysis and Systematic Review. *J Infect Dis.* 2022 Nov 1;226(9):1593-1607. doi: 10.1093/infdis/jiac136. PMID: 35429399; PMCID: PMC9047189.

Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X, Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):507-513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32007143; PMCID: PMC7135076.

Cheng Y, Luo R, Wang K, Zhang M, Wang Z, Dong L, Li J, Yao Y, Ge S, Xu G. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int.* 2020 May;97(5):829-838. doi: 10.1016/j.kint.2020.03.005. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32247631; PMCID: PMC7110296.

Cherian S, Potdar V, Jadhav S, Yadav P, Gupta N, Das M, Rakshit P, Singh S, Abraham P, Panda S, Team N. SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms.* 2021 Jul 20;9(7):1542. doi: 10.3390/microorganisms9071542. PMID: 34361977; PMCID: PMC8307577.

Chu H, Hu B, Huang X, Chai Y, Zhou D, Wang Y, Shuai H, Yang D, Hou Y, Zhang X, Yuen TT, Cai JP, Zhang AJ, Zhou J, Yuan S, To KK, Chan IH, Sit KY, Foo DC, Wong IY, Ng AT, Cheung TT, Law SY, Au WK, Brindley MA, Chen Z, Kok KH, Chan JF, Yuen KY. Host and viral determinants for efficient SARS-CoV-2 infection of the human lung. *Nat Commun.* 2021 Jan 8;12(1):134. doi: 10.1038/s41467-020-20457-w. PMID: 33420022; PMCID: PMC7794309.

Chung M, Bernheim A, Mei X, Zhang N, Huang M, Zeng X, Cui J, Xu W, Yang Y, Fayad ZA, Jacobi A, Li K, Li S, Shan H. CT Imaging Features of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV). *Radiology.* 2020 Apr;295(1):202-207. doi: 10.1148/radiol.2020200230. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32017661; PMCID: PMC7194022.

Crook H, Raza S, Nowell J, Young M, Edison P. Long covid-mechanisms, risk factors, and management. *BMJ.* 2021 Jul 26;374:n1648. doi: 10.1136/bmj.n1648. Erratum in: *BMJ.* 2021 Aug 3;374:n1944. PMID: 34312178.

Dang HH, Malesky E, Nguyen CV. Inequality and support for government responses to COVID-19. *PLoS One.* 2022 Sep 21;17(9):e0272972. doi: 10.1371/journal.pone.0272972. PMID: 36129875; PMCID: PMC9491526.

Daniels BP, Holman DW, Cruz-Orengo L, Jujjavarapu H, Durrant DM, Klein RS. Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *mBio*. 2014 Aug 26;5(5):e01476-14. doi: 10.1128/mBio.01476-14. PMID: 25161189; PMCID: PMC4173776.

Dasgupta A, Kalhan A, Kalra S. Long term complications and rehabilitation of COVID-19 patients. *J Pak Med Assoc*. 2020 May;70(Suppl 3)(5):S131-S135. doi: 10.5455/JPMA.32. PMID: 32515393.

Dashraath P, Wong JLJ, Lim MXK, Lim LM, Li S, Biswas A, Choolani M, Mattar C, Su LL. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2020 Jun;222(6):521-531. doi: 10.1016/j.ajog.2020.03.021. Epub 2020 Mar 23. PMID: 32217113; PMCID: PMC7270569.

Davis HE, Assaf GS, McCorkell L, Wei H, Low RJ, Re'em Y, Redfield S, Austin JP, Akrami A. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. *EClinicalMedicine*. 2021 Aug;38:101019. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101019. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34308300; PMCID: PMC8280690.

Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol*. 2023 Mar;21(3):133-146. doi: 10.1038/s41579-022-00846-2. Epub 2023 Jan 13. Erratum in: *Nat Rev Microbiol*. 2023 Jun;21(6):408. PMID: 36639608; PMCID: PMC9839201.

de Melo GD, Lazarini F, Levallois S, Hautefort C, Michel V, Larrous F, Verillaud B, Aparicio C, Wagner S, Gheusi G, Kergoat L, Kornobis E, Donati F, Cokelaer T, Hervochon R, Madec Y, Roze E, Salmon D, Bourhy H, Lecuit M, Lledo PM. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci Transl Med*. 2021 Jun 2;13(596):eabf8396. doi: 10.1126/scitranslmed.abf8396. Epub 2021 May 3. PMID: 33941622; PMCID: PMC8158965.

De Michele S, Sun Y, Yilmaz MM, Katsyv I, Salvatore M, Dzierba AL, Marboe CC, Brodie D, Patel NM, Garcia CK, Saqi A. Forty Postmortem Examinations in COVID-19 Patients.

Am J Clin Pathol. 2020 Nov 4;154(6):748-760. doi: 10.1093/ajcp/aqaa156. PMID: 32876680; PMCID: PMC7499554.

Deng SQ, Peng HJ. Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. J Clin Med. 2020 Feb 20;9(2):575. doi: 10.3390/jcm9020575. PMID: 32093211; PMCID: PMC7074453.

Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. RNA Biol. 2011 Mar-Apr;8(2):270-9. doi: 10.4161/rna.8.2.15013. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21593585; PMCID: PMC3127101.

Ding Q, Lu P, Fan Y, Xia Y, Liu M. The clinical characteristics of pneumonia patients coinfecting with 2019 novel coronavirus and influenza virus in Wuhan, China. J Med Virol. 2020 Sep;92(9):1549-1555. doi: 10.1002/jmv.25781. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32196707; PMCID: PMC7228290.

Ding X, Xu J, Zhou J, Long Q. Chest CT findings of COVID-19 pneumonia by duration of symptoms. Eur J Radiol. 2020 Jun;127:109009. doi: 10.1016/j.ejrad.2020.109009. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32325282; PMCID: PMC7165099.

Dockery DM, Rowe SG, Murphy MA, Krzystolik MG. The Ocular Manifestations and Transmission of COVID-19: Recommendations for Prevention. J Emerg Med. 2020 Jul;59(1):137-140. doi: 10.1016/j.jemermed.2020.04.060. Epub 2020 May 8. PMID: 32456959; PMCID: PMC7205711.

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. Biol Psychiatry. 2010 Mar 1;67(5):446-57. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.09.033. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20015486.

Doyle ME, Appleton A, Liu QR, Yao Q, Mazucanti CH, Egan JM. Human Type II Taste Cells Express Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Are Infected by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Am J Pathol. 2021 Sep;191(9):1511-1519. doi: 10.1016/j.ajpath.2021.05.010. Epub 2021 Jun 6. PMID: 34102107; PMCID: PMC8179718.

Driggin E, Madhavan MV, Bikdeli B, Chuich T, Laracy J, Biondi-Zoccai G, Brown TS, Der Nigoghossian C, Zidar DA, Haythe J, Brodie D, Beckman JA, Kirtane AJ, Stone GW, Krumholz HM, Parikh SA. Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the COVID-19 Pandemic. *J Am Coll Cardiol*. 2020 May 12;75(18):2352-2371. doi: 10.1016/j.jacc.2020.03.031. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32201335; PMCID: PMC7198856.

Elibol E. Otolaryngological symptoms in COVID-19. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021 Apr;278(4):1233-1236. doi: 10.1007/s00405-020-06319-7. Epub 2020 Sep 1. PMID: 32875391; PMCID: PMC7461752.

Feng G, Zheng KI, Yan QQ, Rios RS, Targher G, Byrne CD, Poucke SV, Liu WY, Zheng MH. COVID-19 and Liver Dysfunction: Current Insights and Emergent Therapeutic Strategies. *J Clin Transl Hepatol*. 2020 Mar 28;8(1):18-24. doi: 10.14218/JCTH.2020.00018. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32274342; PMCID: PMC7132016.

Fenyves BG, Mehta A; MGH COVID-19 Collection & Processing Team; Kays KR, Beakes C, Margolin J, Goldberg MB, Hacoheh N, Filbin MR. Plasma P-selectin is an early marker of thromboembolism in COVID-19. *Am J Hematol*. 2021 Dec 1;96(12):E468-E471. doi: 10.1002/ajh.26372. Epub 2021 Oct 16. PMID: 34622480; PMCID: PMC8616847.

Filchakova O, Dossym D, Ilyas A, Kuanysheva T, Abdizhamil A, Bukasov R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*. 2022 Jul 1;244:123409. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123409. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35390680; PMCID: PMC8970625.

Fournier M, Faille D, Dossier A, Mageau A, Nicaise Roland P, Ajzenberg N, Borie R, Bouadma L, Bunel V, Castier Y, Choquet C, Crestani B, Daugas E, Deconinck L, Descamps D, Descamps V, Dieudé P, Ducrocq G, Faucher N, Goulenok T, Guidoux C, Khalil A, Lavallée P, Lescure FX, Lortat-Jacob B, Mal H, Mutuon P, Pellenc Q, Steg PG, Taille C, Timsit JF, Yazdanpanah Y, Papo T, Sacré K. Arterial Thrombotic Events in Adult Inpatients With COVID-19. *Mayo Clin Proc*. 2021 Feb;96(2):295-303. doi: 10.1016/j.mayocp.2020.11.018. Epub 2020 Nov 27. PMID: 33549252; PMCID: PMC7691140.

Gasmi A, Tippairote T, Mujawdiya PK, Gasmi Benahmed A, Menzel A, Dadar M, Bjørklund G. Neurological Involvements of SARS-CoV2 Infection. *Mol Neurobiol*. 2021

Mar;58(3):944-949. doi: 10.1007/s12035-020-02070-6. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33064267; PMCID: PMC7562688.

Gavrilova N, Soprun L, Lukashenko M, Ryabkova V, Fedotkina TV, Churilov LP, Shoenfeld Y. New Clinical Phenotype of the Post-Covid Syndrome: Fibromyalgia and Joint Hypermobility Condition. *Pathophysiology*. 2022 Jan 19;29(1):24-29. doi: 10.3390/pathophysiology29010003. PMID: 35366287; PMCID: PMC8954589.

Ghannam M, Alshaer Q, Al-Chalabi M, Zakarna L, Robertson J, Manousakis G. Neurological involvement of coronavirus disease 2019: a systematic review. *J Neurol*. 2020 Nov;267(11):3135-3153. doi: 10.1007/s00415-020-09990-2. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32561990; PMCID: PMC7304377

Goldstein DS. The possible association between COVID-19 and postural tachycardia syndrome. *Heart Rhythm*. 2021 Apr;18(4):508-509. doi: 10.1016/j.hrthm.2020.12.007. Epub 2020 Dec 11. PMID: 33316414; PMCID: PMC7729277.

Gralinski LE, Menachery VD. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*. 2020 Jan 24;12(2):135. doi: 10.3390/v12020135. PMID: 31991541; PMCID: PMC7077245.

Greenhalgh T, Knight M, A'Court C, Buxton M, Husain L. Management of post-acute covid-19 in primary care. *BMJ*. 2020 Aug 11;370:m3026. doi: 10.1136/bmj.m3026. PMID: 32784198.

Grobbelaar LM, Venter C, Vlok M, Ngoepe M, Laubscher GJ, Lourens PJ, Steenkamp J, Kell DB, Pretorius E. SARS-CoV-2 spike protein S1 induces fibrin(ogen) resistant to fibrinolysis: implications for microclot formation in COVID-19. *Biosci Rep*. 2021 Aug 27;41(8):BSR20210611. doi: 10.1042/BSR20210611. PMID: 34328172; PMCID: PMC8380922.

Gu H, Chen Q, Yang G, He L, Fan H, Deng YQ, Wang Y, Teng Y, Zhao Z, Cui Y, Li Y, Li XF, Li J, Zhang NN, Yang X, Chen S, Guo Y, Zhao G, Wang X, Luo DY, Wang H, Yang X, Li Y, Han G, He Y, Zhou X, Geng S, Sheng X, Jiang S, Sun S, Qin CF, Zhou Y. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science*. 2020 Sep 25;369(6511):1603-1607. doi: 10.1126/science.abc4730. Epub 2020 Jul 30. PMID: 32732280; PMCID: PMC7574913.

Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, Du B, Li LJ, Zeng G, Yuen KY, Chen RC, Tang CL, Wang T, Chen PY, Xiang J, Li SY, Wang JL, Liang ZJ, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY, Zhong NS; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020 Apr 30;382(18):1708-1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32109013; PMCID: PMC7092819.

Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JS, Poon LL. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*. 2003 Oct 10;302(5643):276-8. doi: 10.1126/science.1087139. Epub 2003 Sep 4. PMID: 12958366.

Guedj E, Champion JY, Dudouet P, Kaphan E, Bregeon F, Tissot-Dupont H, Guis S, Barthelemy F, Habert P, Ceccaldi M, Million M, Raoult D, Cammilleri S, Eldin C. ¹⁸F-FDG brain PET hypometabolism in patients with long COVID. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021 Aug;48(9):2823-2833. doi: 10.1007/s00259-021-05215-4. Epub 2021 Jan 26. PMID: 33501506; PMCID: PMC7837643.

Halaji M, Heiat M, Faraji N, Ranjbar R. Epidemiology of COVID-19: An updated review. *J Res Med Sci*. 2021 Sep 30;26:82. doi: 10.4103/jrms.JRMS_506_20. PMID: 34759999; PMCID: PMC8548902.

Harris AG, Skalak TC. Effects of leukocyte activation on capillary hemodynamics in skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1993 Mar;264(3 Pt 2):H909-16. doi: 10.1152/ajpheart.1993.264.3.H909. PMID: 8456992.

Harvey TS. COVID-19, Framing and Naming a Pandemic: How What Is Not in a Disease Name May Be More Important than What Is. *Pathogens*. 2023 Feb 18;12(2):346. doi: 10.3390/pathogens12020346. PMID: 36839618; PMCID: PMC9961926.

Hassan SA, Sheikh FN, Jamal S, Ezeh JK, Akhtar A. Coronavirus (COVID-19): A Review of Clinical Features, Diagnosis, and Treatment. *Cureus*. 2020 Mar 21;12(3):e7355. doi: 10.7759/cureus.7355. PMID: 32328367; PMCID: PMC7170025.

Helms J, Combes A, Aissaoui N. Cardiac injury in COVID-19. *Intensive Care Med*. 2022 Jan;48(1):111-113. doi: 10.1007/s00134-021-06555-3. Epub 2021 Nov 2. PMID: 34727214; PMCID: PMC8562019.

Herrera-Valdés R, Almaguer-López M, López-Marín L, Bacallao-Méndez R, F J, Guerra-Bustillo G. COVID-19 and the Kidneys: Risk, Damage and Sequelae. *MEDICC Rev.* 2020 Oct;22(4):87-88. doi: 10.37757/MR2020.V22.N4.10. PMID: 33295327.

Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. *Proc Nutr Soc.* 2012 Feb;71(1):50-61. doi: 10.1017/S0029665111001650. Epub 2011 Aug 18. PMID: 21849106.

Hoang VT, Dao TL, Gautret P. Recurrence of positive SARS-CoV-2 in patients recovered from COVID-19. *J Med Virol.* 2020 Nov;92(11):2366-2367. doi: 10.1002/jmv.26056. Epub 2020 Jul 11. PMID: 32449789; PMCID: PMC7280660.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32142651; PMCID: PMC7102627.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32142651; PMCID: PMC7102627.

Holmes EC. Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends Microbiol.* 2003 Dec;11(12):543-6. doi: 10.1016/j.tim.2003.10.006. PMID: 14659685; PMCID: PMC7172642.

Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Mar;19(3):141-154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7. Epub 2020 Oct 6. Erratum in: *Nat Rev Microbiol.* 2022 May;20(5):315. PMID: 33024307; PMCID: PMC7537588.

Hu F, Chen F, Ou Z, Fan Q, Tan X, Wang Y, Pan Y, Ke B, Li L, Guan Y, Mo X, Wang J, Wang J, Luo C, Wen X, Li M, Ren P, Ke C, Li J, Lei C, Tang X, Li F. A compromised specific humoral immune response against the SARS-CoV-2 receptor-binding domain is related to viral persistence and periodic shedding in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Immunol.* 2020 Nov;17(11):1119-1125. doi: 10.1038/s41423-020-00550-2. Epub 2020 Oct 9. PMID: 33037400; PMCID: PMC7546387.

Huang B, Cai Y, Li N, Li K, Wang Z, Li L, Wu L, Zhu M, Li J, Wang Z, Wu M, Li W, Wu W, Zhang L, Xia X, Wang S, Chen H, Wang Q. Sex-based clinical and immunological differences in COVID-19. *BMC Infect Dis.* 2021 Jul 5;21(1):647. doi: 10.1186/s12879-021-06313-2. PMID: 34225644; PMCID: PMC8256650.

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: *Lancet.* 2020 Jan 30;: PMID: 31986264; PMCID: PMC7159299.

Illiano E, Trama F, Costantini E. Could COVID-19 have an impact on male fertility? *Andrologia.* 2020 Jul;52(6):e13654. doi: 10.1111/and.13654. Epub 2020 May 21. PMID: 32436229; PMCID: PMC7267130.

Iwasaki S, Fujisawa S, Nakakubo S, Kamada K, Yamashita Y, Fukumoto T, Sato K, Oguri S, Taki K, Senjo H, Sugita J, Hayasaka K, Konno S, Nishida M, Teshima T. Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva. *J Infect.* 2020 Aug;81(2):e145-e147. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.071. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32504740; PMCID: PMC7270800.

Jacobi A, Chung M, Bernheim A, Eber C. Portable chest X-ray in coronavirus disease-19 (COVID-19): A pictorial review. *Clin Imaging.* 2020 Aug;64:35-42. doi: 10.1016/j.clinimag.2020.04.001. Epub 2020 Apr 8. PMID: 32302927; PMCID: PMC7141645.

Jacobs J. Persistent SARS-2 infections contribute to long COVID-19. *Med Hypotheses.* 2021 Apr;149:110538. doi: 10.1016/j.mehy.2021.110538. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33621843; PMCID: PMC7884250.

Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology.* 2017 Feb;25(1):11-24. doi: 10.1007/s10787-017-0309-4. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28083748; PMCID: PMC5306179.

Jarrahi A, Ahluwalia M, Khodadadi H, da Silva Lopes Salles E, Kolhe R, Hess DC, Vale F, Kumar M, Baban B, Vaibhav K, Dhandapani KM. Neurological consequences of COVID-19: what have we learned and where do we go from here? *J Neuroinflammation*. 2020 Sep 30;17(1):286. doi: 10.1186/s12974-020-01957-4. PMID: 32998763; PMCID: PMC7525232.

Jarrott B, Head R, Pringle KG, Lumbers ER, Martin JH. "LONG COVID"-A hypothesis for understanding the biological basis and pharmacological treatment strategy. *Pharmacol Res Perspect*. 2022 Feb;10(1):e00911. doi: 10.1002/prp2.911. PMID: 35029046; PMCID: PMC8929332.

Jiang S, Du L, Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Jan 31;9(1):275-277. doi: 10.1080/22221751.2020.1723441. Erratum in: *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):539. PMID: 32005086; PMCID: PMC7033706.

Jiang X, Rayner S, Luo MH. Does SARS-CoV-2 has a longer incubation period than SARS and MERS? *J Med Virol*. 2020 May;92(5):476-478. doi: 10.1002/jmv.25708. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32056235; PMCID: PMC7166592.

Jones VG, Mills M, Suarez D, Hogan CA, Yeh D, Segal JB, Nguyen EL, Barsh GR, Maskatia S, Mathew R. COVID-19 and Kawasaki Disease: Novel Virus and Novel Case. *Hosp Pediatr*. 2020 Jun;10(6):537-540. doi: 10.1542/hpeds.2020-0123. Epub 2020 Apr 7. PMID: 32265235.

Kalkeri R, Goebel S, Sharma GD. SARS-CoV-2 Shedding from Asymptomatic Patients: Contribution of Potential Extrapulmonary Tissue Reservoirs. *Am J Trop Med Hyg*. 2020 Jul;103(1):18-21. doi: 10.4269/ajtmh.20-0279. Epub 2020 May 13. PMID: 32406369; PMCID: PMC7356473.

Kedor C, Freitag H, Meyer-Arndt L, Wittke K, Hanitsch LG, Zoller T, Steinbeis F, Haffke M, Rudolf G, Heidecker B, Bobbert T, Spranger J, Volk HD, Skurk C, Konietschke F, Paul F, Behrends U, Bellmann-Strobl J, Scheibenbogen C. A prospective observational study of post-COVID-19 chronic fatigue syndrome following the first pandemic wave in Germany and biomarkers associated with symptom severity. *Nat Commun*. 2022 Aug 30;13(1):5104. doi: 10.1038/s41467-022-32507-6. Erratum in: *Nat Commun*. 2022 Oct 12;13(1):6009. PMID: 36042189; PMCID: PMC9426365.

Kell DB, Laubscher GJ, Pretorius E. A central role for amyloid fibrin microclots in long COVID/PASC: origins and therapeutic implications. *Biochem J.* 2022 Feb 17;479(4):537-559. doi: 10.1042/BCJ20220016. PMID: 35195253; PMCID: PMC8883497.

Kell DB, Pretorius E. The potential role of ischaemia-reperfusion injury in chronic, relapsing diseases such as rheumatoid arthritis, Long COVID, and ME/CFS: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Biochem J.* 2022 Aug 31;479(16):1653-1708. doi: 10.1042/BCJ20220154. PMID: 36043493; PMCID: PMC9484810.

Kipkorir V, Cheruiyot I, Ngure B, Misiani M, Munguti J. Prolonged SARS-CoV-2 RNA detection in anal/rectal swabs and stool specimens in COVID-19 patients after negative conversion in nasopharyngeal RT-PCR test. *J Med Virol.* 2020 Nov;92(11):2328-2331. doi: 10.1002/jmv.26007. Epub 2020 Aug 2. PMID: 32401374; PMCID: PMC7272912.

Kobayashi Y, Mitsudomi T. Management of ground-glass opacities: should all pulmonary lesions with ground-glass opacity be surgically resected? *Transl Lung Cancer Res.* 2013 Oct;2(5):354-63. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.09.03. PMID: 25806254; PMCID: PMC4367726.

Koc HC, Xiao J, Liu W, Li Y, Chen G. Long COVID and its Management. *Int J Biol Sci.* 2022 Jul 11;18(12):4768-4780. doi: 10.7150/ijbs.75056. PMID: 35874958; PMCID: PMC9305273.

Kochi AN, Tagliari AP, Forleo GB, Fassini GM, Tondo C. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2020 May;31(5):1003-1008. doi: 10.1111/jce.14479. Epub 2020 Apr 13. PMID: 32270559; PMCID: PMC7262150.

Kong M, Zhang H, Cao X, Mao X, Lu Z. Higher level of neutrophil-to-lymphocyte is associated with severe COVID-19. *Epidemiol Infect.* 2020 Jul 9;148:e139. doi: 10.1017/S0950268820001557. PMID: 32641174; PMCID: PMC7360950.

König RS, Albrich WC, Kahlert CR, Bahr LS, Löber U, Vernazza P, Scheibenbogen C, Forslund SK. The Gut Microbiome in Myalgic Encephalomyelitis (ME)/Chronic Fatigue Syndrome (CFS). *Front Immunol.* 2022 Jan 3;12:628741. doi: 10.3389/fimmu.2021.628741. Erratum in: *Front Immunol.* 2022 Mar 30;13:878196. PMID: 35046929; PMCID: PMC8761622.

Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, Hengartner N, Giorgi EE, Bhattacharya T, Foley B, Hastie KM, Parker MD, Partridge DG, Evans CM, Freeman TM, de Silva TI; Sheffield COVID-19 Genomics Group; McDanal C, Perez LG, Tang H, Moon-Walker A, Whelan SP, LaBranche CC, Saphire EO, Montefiori DC. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. 2020 Aug 20;182(4):812-827.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043. Epub 2020 Jul 3. PMID: 32697968; PMCID: PMC7332439.

Kruger A, Vlok M, Turner S, Venter C, Laubscher GJ, Kell DB, Pretorius E. Proteomics of fibrin amyloid microclots in long COVID/post-acute sequelae of COVID-19 (PASC) shows many entrapped pro-inflammatory molecules that may also contribute to a failed fibrinolytic system. *Cardiovasc Diabetol*. 2022 Sep 21;21(1):190. doi: 10.1186/s12933-022-01623-4. PMID: 36131342; PMCID: PMC9491257.

Labé P, Ly A, Sin C, Nasser M, Chapelon-Fromont E, Ben Saïd P, Mahé E. Erythema multiforme and Kawasaki disease associated with COVID-19 infection in children. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 Oct;34(10):e539-e541. doi: 10.1111/jdv.16666. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32455505; PMCID: PMC7283825.

Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, Ravelli RBG, Paul van Schayck J, Mykytyn AZ, Duimel HQ, van Donselaar E, Riesebosch S, Kuijpers HJH, Schipper D, van de Wetering WJ, de Graaf M, Koopmans M, Cuppen E, Peters PJ, Haagmans BL, Clevers H. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science*. 2020 Jul 3;369(6499):50-54. doi: 10.1126/science.abc1669. Epub 2020 May 1. PMID: 32358202; PMCID: PMC7199907.

Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020 May;581(7807):215-220. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32225176.

Larsen NW, Stiles LE, Shaik R, Schneider L, Muppidi S, Tsui CT, Geng LN, Bonilla H, Miglis MG. Characterization of autonomic symptom burden in long COVID: A global survey of 2,314 adults. *Front Neurol*. 2022 Oct 19;13:1012668. doi: 10.3389/fneur.2022.1012668. PMID: 36353127; PMCID: PMC9639503.

- Le Stang MB, Desenclos J, Flamant M, Chousterman BG, Tabibzadeh N. The Good Treatment, the Bad Virus, and the Ugly Inflammation: Pathophysiology of Kidney Involvement During COVID-19. *Front Physiol.* 2021 Mar 11;12:613019. doi: 10.3389/fphys.2021.613019. PMID: 33776785; PMCID: PMC7993058.
- Lesmana R, Zuhendri F, Fearnley J, Irsyam IA, Rasyid RPHN, Abidin T, Abdulah R, Suwantika A, Paradkar A, Budiman AS, Pasang T. The Suitability of Propolis as a Bioactive Component of Biomaterials. *Front Pharmacol.* 2022 Jun 8;13:930515. doi: 10.3389/fphar.2022.930515. PMID: 35754488; PMCID: PMC9213800.
- Li B, Deng A, Li K, Hu Y, Li Z, Shi Y, Xiong Q, Liu Z, Guo Q, Zou L, Zhang H, Zhang M, Ouyang F, Su J, Su W, Xu J, Lin H, Sun J, Peng J, Jiang H, Zhou P, Hu T, Luo M, Zhang Y, Zheng H, Xiao J, Liu T, Tan M, Che R, Zeng H, Zheng Z, Huang Y, Yu J, Yi L, Wu J, Chen J, Zhong H, Deng X, Kang M, Pybus OG, Hall M, Lythgoe KA, Li Y, Yuan J, He J, Lu J. Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. *Nat Commun.* 2022 Jan 24;13(1):460. doi: 10.1038/s41467-022-28089-y. PMID: 35075154; PMCID: PMC8786931.
- Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Cramer G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005 Oct 28;310(5748):676-9. doi: 10.1126/science.1118391. Epub 2005 Sep 29. PMID: 16195424.
- Li Y, Li H, Fan R, Wen B, Zhang J, Cao X, Wang C, Song Z, Li S, Li X, Lv X, Qu X, Huang R, Liu W. Coronavirus Infections in the Central Nervous System and Respiratory Tract Show Distinct Features in Hospitalized Children. *Intervirology.* 2016;59(3):163-169. doi: 10.1159/000453066. Epub 2017 Jan 20. PMID: 28103598; PMCID: PMC7179523.
- Li Y, Renner DM, Comar CE, Whelan JN, Reyes HM, Cardenas-Diaz FL, Truitt R, Tan LH, Dong B, Alysandratos KD, Huang J, Palmer JN, Adappa ND, Kohanski MA, Kotton DN, Silverman RH, Yang W, Morrisey EE, Cohen NA, Weiss SR. SARS-CoV-2 induces double-stranded RNA-mediated innate immune responses in respiratory epithelial-derived cells and cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Apr 20;118(16):e2022643118. doi: 10.1073/pnas.2022643118. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Jul 18;120(29):e2310153120. PMID: 33811184; PMCID: PMC8072330.
- Liotta EM, Batra A, Clark JR, Shlobin NA, Hoffman SC, Orban ZS, Koralknik IJ. Frequent neurologic manifestations and encephalopathy-associated morbidity in Covid-19 patients.

Ann Clin Transl Neurol. 2020 Nov;7(11):2221-2230. doi: 10.1002/acn3.51210. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33016619; PMCID: PMC7664279.

Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. Clin Chem Lab Med. 2020 Jun 25;58(7):1131-1134. doi: 10.1515/cclm-2020-0198. PMID: 32119647.

Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcorn ED, Leigh R, Brown JP, Cohen A, Kim H. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. Allergy Asthma Clin Immunol. 2013 Aug 15;9(1):30. doi: 10.1186/1710-1492-9-30. PMID: 23947590; PMCID: PMC3765115.

Liu Q, Mak JWY, Su Q, Yeoh YK, Lui GC, Ng SSS, Zhang F, Li AYL, Lu W, Hui DS, Chan PK, Chan FKL, Ng SC. Gut microbiota dynamics in a prospective cohort of patients with post-acute COVID-19 syndrome. Gut. 2022 Mar;71(3):544-552. doi: 10.1136/gutjnl-2021-325989. Epub 2022 Jan 26. PMID: 35082169.

Liu Y, Liu J, Xia H, Zhang X, Fontes-Garfias CR, Swanson KA, Cai H, Sarkar R, Chen W, Cutler M, Cooper D, Weaver SC, Muik A, Sahin U, Jansen KU, Xie X, Dormitzer PR, Shi PY. Neutralizing Activity of BNT162b2-Elicited Serum. N Engl J Med. 2021 Apr 15;384(15):1466-1468. doi: 10.1056/NEJMc2102017. Epub 2021 Mar 8. PMID: 33684280; PMCID: PMC7944950.

Lu Y, Li X, Geng D, Mei N, Wu PY, Huang CC, Jia T, Zhao Y, Wang D, Xiao A, Yin B. Cerebral Micro-Structural Changes in COVID-19 Patients - An MRI-based 3-month Follow-up Study. EClinicalMedicine. 2020 Aug;25:100484. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100484. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32838240; PMCID: PMC7396952.

Mancini DM, Brunjes DL, Lala A, Trivieri MG, Contreras JP, Natelson BH. Use of Cardiopulmonary Stress Testing for Patients With Unexplained Dyspnea Post-Coronavirus Disease. JACC Heart Fail. 2021 Dec;9(12):927-937. doi: 10.1016/j.jchf.2021.10.002. PMID: 34857177; PMCID: PMC8629098.

Mandal S, Barnett J, Brill SE, Brown JS, Denny EK, Hare SS, Heightman M, Hillman TE, Jacob J, Jarvis HC, Lipman MCI, Naidu SB, Nair A, Porter JC, Tomlinson GS, Hurst JR; ARC Study Group. 'Long-COVID': a cross-sectional study of persisting symptoms, biomarker and imaging abnormalities following hospitalisation for COVID-19. Thorax. 2021 Apr;76(4):396-398. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-215818. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33172844.

Mehta OP, Bhandari P, Raut A, Kacimi SEO, Huy NT. Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive Review of Clinical Presentation. *Front Public Health*. 2021 Jan 15;8:582932. doi: 10.3389/fpubh.2020.582932. PMID: 33520910; PMCID: PMC7844320.

Menni C, Valdes AM, Freidin MB, Sudre CH, Nguyen LH, Drew DA, Ganesh S, Varsavsky T, Cardoso MJ, El-Sayed Moustafa JS, Visconti A, Hysi P, Bowyer RCE, Mangino M, Falchi M, Wolf J, Ourselin S, Chan AT, Steves CJ, Spector TD. Real-time tracking of self-reported symptoms to predict potential COVID-19. *Nat Med*. 2020 Jul;26(7):1037-1040. doi: 10.1038/s41591-020-0916-2. Epub 2020 May 11. PMID: 32393804; PMCID: PMC7751267.

Meringer H, Mehandru S. Gastrointestinal post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022 Jun;19(6):345-346. doi: 10.1038/s41575-022-00611-z. PMID: 35383321; PMCID: PMC8981882.

Mlcochova P, Kemp SA, Dhar MS, Papa G, Meng B, Ferreira IATM, Datir R, Collier DA, Albecka A, Singh S, Pandey R, Brown J, Zhou J, Goonawardane N, Mishra S, Whittaker C, Mellan T, Marwal R, Datta M, Sengupta S, Ponnusamy K, Radhakrishnan VS, Abdullahi A, Charles O, Chattopadhyay P, Devi P, Caputo D, Peacock T, Wattal C, Goel N, Satwik A, Vaishya R, Agarwal M; Indian SARS-CoV-2 Genomics Consortium (INSACOG); Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; CITIID-NIHR BioResource COVID-19 Collaboration; Mavousian A, Lee JH, Bassi J, Silacci-Fegni C, Saliba C, Pinto D, Irie T, Yoshida I, Hamilton WL, Sato K, Bhatt S, Flaxman S, James LC, Corti D, Piccoli L, Barclay WS, Rakshit P, Agrawal A, Gupta RK. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature*. 2021 Nov;599(7883):114-119. doi: 10.1038/s41586-021-03944-y. Epub 2021 Sep 6. PMID: 34488225; PMCID: PMC8566220.

Morens DM, Breman JG, Calisher CH, Doherty PC, Hahn BH, Keusch GT, Kramer LD, LeDuc JW, Monath TP, Taubenberger JK. The Origin of COVID-19 and Why It Matters. *Am J Trop Med Hyg*. 2020 Sep;103(3):955-959. doi: 10.4269/ajtmh.20-0849. PMID: 32700664; PMCID: PMC7470595.

Moriguchi T, Harii N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J, Ueno M, Sakata H, Kondo K, Myose N, Nakao A, Takeda M, Haro H, Inoue O, Suzuki-Inoue K, Kubokawa K, Ogihara S, Sasaki T, Kinouchi H, Kojin H, Ito M, Onishi H, Shimizu T, Sasaki Y, Enomoto N, Ishihara H, Furuya S, Yamamoto T, Shimada S. A first case of meningitis/encephalitis

associated with SARS-Coronavirus-2. *Int J Infect Dis.* 2020 May;94:55-58. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.062. Epub 2020 Apr 3. PMID: 32251791; PMCID: PMC7195378.

Morrissey SM, Geller AE, Hu X, Tieri D, Ding C, Klaes CK, Cooke EA, Woeste MR, Martin ZC, Chen O, Bush SE, Zhang HG, Cavallazzi R, Clifford SP, Chen J, Ghare S, Barve SS, Cai L, Kong M, Rouchka EC, McLeish KR, Uriarte SM, Watson CT, Huang J, Yan J. A specific low-density neutrophil population correlates with hypercoagulation and disease severity in hospitalized COVID-19 patients. *JCI Insight.* 2021 May 10;6(9):e148435. doi: 10.1172/jci.insight.148435. PMID: 33986193; PMCID: PMC8262329.

Moyano A JR, Mejía Torres S, Espinosa J. Vagus nerve neuropathy related to SARS COV-2 infection. *IDCases.* 2021;26:e01242. doi: 10.1016/j.idcr.2021.e01242. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34401328; PMCID: PMC8357529.

Muus C, Luecken MD, Eraslan G, Sikkema L, Waghay A, Heimberg G, Kobayashi Y, Vaishnav ED, Subramanian A, Smillie C, Jagadeesh KA, Duong ET, Fiskin E, Torlai Triglia E, Ansari M, Cai P, Lin B, Buchanan J, Chen S, Shu J, Haber AL, Chung H, Montoro DT, Adams T, Aliee H, Allon SJ, Andrusivova Z, Angelidis I, Ashenberg O, Bassler K, Bécavin C, Benhar I, Bergensträhle J, Bergensträhle L, Bolt L, Braun E, Bui LT, Callori S, Chaffin M, Chichelnitskiy E, Chiou J, Conlon TM, Cuoco MS, Cuomo ASE, Deprez M, Duclos G, Fine D, Fischer DS, Ghazanfar S, Gillich A, Giotti B, Gould J, Guo M, Gutierrez AJ, Habermann AC, Harvey T, He P, Hou X, Hu L, Hu Y, Jaiswal A, Ji L, Jiang P, Kapellos TS, Kuo CS, Larsson L, Leney-Greene MA, Lim K, Litviňuková M, Ludwig LS, Lukassen S, Luo W, Maatz H, Madisson E, Mamanova L, Manakongtreecheep K, Leroy S, Mayr CH, Mbano IM, McAdams AM, Nabhan AN, Nyquist SK, Penland L, Poirion OB, Poli S, Qi C, Queen R, Reichart D, Rosas I, Schupp JC, Shea CV, Shi X, Sinha R, Sit RV, Slowikowski K, Slyper M, Smith NP, Sountoulidis A, Strunz M, Sullivan TB, Sun D, Talavera-López C, Tan P, Tantivit J, Travaglini KJ, Tucker NR, Vernon KA, Wadsworth MH, Waldman J, Wang X, Xu K, Yan W, Zhao W, Ziegler CGK; NHLBI LungMap Consortium; Human Cell Atlas Lung Biological Network. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med.* 2021 Mar;27(3):546-559. doi: 10.1038/s41591-020-01227-z. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33654293; PMCID: PMC9469728.

Noce A, Albanese M, Marrone G, Di Lauro M, Pietroboni Zaitseva A, Palazzetti D, Guerriero C, Paolino A, Pizzenti G, Di Daniele F, Romani A, D'Agostini C, Magrini A, Mercuri NB, Di Daniele N. Ultramicronized Palmitoylethanolamide (um-PEA): A New

Possible Adjuvant Treatment in COVID-19 patients. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Apr 6;14(4):336. doi: 10.3390/ph14040336. PMID: 33917573; PMCID: PMC8067485.

Noce A, Bocedi A, Campo M, Marrone G, Di Lauro M, Cattani G, Di Daniele N, Romani A. A Pilot Study of a Natural Food Supplement as New Possible Therapeutic Approach in Chronic Kidney Disease Patients. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Jul 10;13(7):148. doi: 10.3390/ph13070148. PMID: 32664308; PMCID: PMC7408446.

Novak P. Post COVID-19 syndrome associated with orthostatic cerebral hypoperfusion syndrome, small fiber neuropathy and benefit of immunotherapy: a case report. *eNeurologicalSci*. 2020 Dec;21:100276. doi: 10.1016/j.ensci.2020.100276. Epub 2020 Sep 20. PMID: 32984564; PMCID: PMC7502253.

Nunes JM, Kruger A, Proal A, Kell DB, Pretorius E. The Occurrence of Hyperactivated Platelets and Fibrinoid Microclots in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS). *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Jul 27;15(8):931. doi: 10.3390/ph15080931. PMID: 36015078; PMCID: PMC9413879.

Ojo AS, Balogun SA, Williams OT, Ojo OS. Pulmonary Fibrosis in COVID-19 Survivors: Predictive Factors and Risk Reduction Strategies. *Pulm Med*. 2020 Aug 10;2020:6175964. doi: 10.1155/2020/6175964. PMID: 32850151; PMCID: PMC7439160.

Oude Munnink BB, Sikkema RS, Nieuwenhuijse DF, Molenaar RJ, Munger E, Molenkamp R, van der Spek A, Tolsma P, Rietveld A, Brouwer M, Bouwmeester-Vincken N, Harders F, Hakze-van der Honing R, Wegdam-Blans MCA, Bouwstra RJ, GeurtsvanKessel C, van der Eijk AA, Velkers FC, Smit LAM, Stegeman A, van der Poel WHM, Koopmans MPG. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. *Science*. 2021 Jan 8;371(6525):172-177. doi: 10.1126/science.abe5901. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33172935; PMCID: PMC7857398.

Pagani I, Ghezzi S, Alberti S, Poli G, Vicenzi E. Origin and evolution of SARS-CoV-2. *Eur Phys J Plus*. 2023;138(2):157. doi: 10.1140/epjp/s13360-023-03719-6. Epub 2023 Feb 16. PMID: 36811098; PMCID: PMC9933829.

Pan F, Ye T, Sun P, Gui S, Liang B, Li L, Zheng D, Wang J, Hesketh RL, Yang L, Zheng C. Time Course of Lung Changes at Chest CT during Recovery from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Radiology*. 2020 Jun;295(3):715-721. doi: 10.1148/radiol.2020200370. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32053470; PMCID: PMC7233367.

Pan L, Mu M, Yang P, Sun Y, Wang R, Yan J, Li P, Hu B, Wang J, Hu C, Jin Y, Niu X, Ping R, Du Y, Li T, Xu G, Hu Q, Tu L. Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study. *Am J Gastroenterol*. 2020 May;115(5):766-773. doi: 10.14309/ajg.0000000000000620. PMID: 32287140; PMCID: PMC7172492.

Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr;20(4):411-412. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30113-4. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32105638; PMCID: PMC7128099.

Panaro MA, Porro C. Bioactive Natural Compounds for Therapeutic and Nutraceutical Applications in Neurodegeneration. *Nutrients*. 2022 May 26;14(11):2216. doi: 10.3390/nu14112216. PMID: 35684015; PMCID: PMC9182781.

Patrucco F, Albera C, Bellocchia M, Foci V, Gavelli F, Castello LM, Bellan M, Sainaghi PP, Airoidi C, Balbo PE, Solidoro P. SARS-CoV-2 Detection on Bronchoalveolar Lavage: An Italian Multicenter experience. *Respiration*. 2020;99(11):970-978. doi: 10.1159/000511964. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33075793; PMCID: PMC7649696.

Patterson BK, Guevara-Coto J, Yogendra R, Francisco EB, Long E, Pise A, Rodrigues H, Parikh P, Mora J, Mora-Rodríguez RA. Immune-Based Prediction of COVID-19 Severity and Chronicity Decoded Using Machine Learning. *Front Immunol*. 2021 Jun 28;12:700782. doi: 10.3389/fimmu.2021.700782. PMID: 34262570; PMCID: PMC8273732.

Peng QY, Wang XT, Zhang LN; Chinese Critical Care Ultrasound Study Group (CCUSG). Findings of lung ultrasonography of novel corona virus pneumonia during the 2019-2020 epidemic. *Intensive Care Med*. 2020 May;46(5):849-850. doi: 10.1007/s00134-020-05996-6. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32166346; PMCID: PMC7080149.

Pimentel V, Luchsinger VW, Carvalho GL, Alcará AM, Esper NB, Marinowic D, Zanirati G, da Costa JC. Guillain-Barré syndrome associated with COVID-19: A systematic review. *Brain Behav Immun Health*. 2023 Mar;28:100578. doi: 10.1016/j.bbih.2022.100578. Epub 2023 Jan 17. PMID: 36686624; PMCID: PMC9842533.

Plante JA, Liu Y, Liu J, Xia H, Johnson BA, Lokugamage KG, Zhang X, Muruato AE, Zou J, Fontes-Garfias CR, Mirchandani D, Scharton D, Bilello JP, Ku Z, An Z, Kalveram B, Freiberg AN, Menachery VD, Xie X, Plante KS, Weaver SC, Shi PY. Spike mutation

D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*. 2021 Apr;592(7852):116-121. doi: 10.1038/s41586-020-2895-3. Epub 2020 Oct 26. Erratum in: *Nature*. 2021 Jul;595(7865):E1. PMID: 33106671; PMCID: PMC8158177.

Pretorius E, Venter C, Laubscher GJ, Kotze MJ, Oladejo SO, Watson LR, Rajaratnam K, Watson BW, Kell DB. Prevalence of symptoms, comorbidities, fibrin amyloid microclots and platelet pathology in individuals with Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC). *Cardiovasc Diabetol*. 2022 Aug 6;21(1):148. doi: 10.1186/s12933-022-01579-5. PMID: 35933347; PMCID: PMC9356426.

Pretorius E, Vlok M, Venter C, Bezuidenhout JA, Laubscher GJ, Steenkamp J, Kell DB. Persistent clotting protein pathology in Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) is accompanied by increased levels of antiplasmin. *Cardiovasc Diabetol*. 2021 Aug 23;20(1):172. doi: 10.1186/s12933-021-01359-7. PMID: 34425843; PMCID: PMC8381139.

Proal AD, Lindseth IA, Marshall TG. Microbe-microbe and host-microbe interactions drive microbiome dysbiosis and inflammatory processes. *Discov Med*. 2017 Jan;23(124):51-60. PMID: 28245427.

Proal AD, VanElzakker MB. Long COVID or Post-acute Sequelae of COVID-19 (PASC): An Overview of Biological Factors That May Contribute to Persistent Symptoms. *Front Microbiol*. 2021 Jun 23;12:698169. doi: 10.3389/fmicb.2021.698169. PMID: 34248921; PMCID: PMC8260991.

Puig-Domingo M, Marazuela M, Giustina A. COVID-19 and endocrine diseases. A statement from the European Society of Endocrinology. *Endocrine*. 2020 Apr;68(1):2-5. doi: 10.1007/s12020-020-02294-5. PMID: 32279224; PMCID: PMC7150529.

Qu R, Ling Y, Zhang YH, Wei LY, Chen X, Li XM, Liu XY, Liu HM, Guo Z, Ren H, Wang Q. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J Med Virol*. 2020 Sep;92(9):1533-1541. doi: 10.1002/jmv.25767. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32181903; PMCID: PMC7228291.

Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 2008 Aug 13;118(3):418-28. doi: 10.1016/j.jep.2008.05.005. Epub 2008 May 13. PMID: 18556162; PMCID: PMC2553885.

Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, du Plessis L, Pybus OG. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol.* 2020 Nov;5(11):1403-1407. doi: 10.1038/s41564-020-0770-5. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32669681; PMCID: PMC7610519.

Rasmussen SA, Smulian JC, Lednicky JA, Wen TS, Jamieson DJ. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and pregnancy: what obstetricians need to know. *Am J Obstet Gynecol.* 2020 May;222(5):415-426. doi: 10.1016/j.ajog.2020.02.017. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32105680; PMCID: PMC7093856.

Raveendran AV, Jayadevan R, Sashidharan S. Long COVID: An overview. *Diabetes Metab Syndr.* 2021 May-Jun;15(3):869-875. doi: 10.1016/j.dsx.2021.04.007. Epub 2021 Apr 20. Erratum in: *Diabetes Metab Syndr.* 2022 May;16(5):102504. Erratum in: *Diabetes Metab Syndr.* 2022 Dec;16(12):102660. PMID: 33892403; PMCID: PMC8056514.

Reiken S, Sittenfeld L, Dridi H, Liu Y, Liu X, Marks AR. Alzheimer's-like signaling in brains of COVID-19 patients. *Alzheimers Dement.* 2022 May;18(5):955-965. doi: 10.1002/alz.12558. Epub 2022 Feb 3. PMID: 35112786; PMCID: PMC9011576.

Ren AL, Digby RJ, Needham EJ. Neurological update: COVID-19. *J Neurol.* 2021 Nov;268(11):4379-4387. doi: 10.1007/s00415-021-10581-y. Epub 2021 Apr 30. PMID: 33929617; PMCID: PMC8085652.

Rhea EM, Logsdon AF, Hansen KM, Williams LM, Reed MJ, Baumann KK, Holden SJ, Raber J, Banks WA, Erickson MA. The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice. *Nat Neurosci.* 2021 Mar;24(3):368-378. doi: 10.1038/s41593-020-00771-8. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33328624; PMCID: PMC8793077.

Ribeiro R, Botelho FD, Pinto AMV, La Torre AMA, Almeida JSFD, LaPlante SR, Franca TCC, Veiga-Junior VF, Dos Santos MC. Molecular modeling study of natural products as potential bioactive compounds against SARS-CoV-2. *J Mol Model.* 2023 May 22;29(6):183. doi: 10.1007/s00894-023-05586-5. PMID: 37212923; PMCID: PMC10201022.

Roman I, Stănilă A, Stănilă S. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chem Cent J.* 2013 Apr 23;7(1):73. doi: 10.1186/1752-153X-7-73. PMID: 23618509; PMCID: PMC3668991.

Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun.* 2020 May;109:102433. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102433. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32113704; PMCID: PMC7127067.

Ruzieh M, Batizy L, Dasa O, Oostra C, Grubb B. The role of autoantibodies in the syndromes of orthostatic intolerance: a systematic review. *Scand Cardiovasc J.* 2017 Oct;51(5):243-247. doi: 10.1080/14017431.2017.1355068. Epub 2017 Jul 24. PMID: 28738696.

Ryan FJ, Hope CM, Masavuli MG, Lynn MA, Mekonnen ZA, Yeow AEL, Garcia-Valtanen P, Al-Delfi Z, Gummow J, Ferguson C, O'Connor S, Reddi BAJ, Hissaria P, Shaw D, Kok-Lim C, Gleadle JM, Beard MR, Barry SC, Grubor-Bauk B, Lynn DJ. Long-term perturbation of the peripheral immune system months after SARS-CoV-2 infection. *BMC Med.* 2022 Jan 14;20(1):26. doi: 10.1186/s12916-021-02228-6. PMID: 35027067; PMCID: PMC8758383.

Sachdeva M, Gianotti R, Shah M, Bradanini L, Tosi D, Veraldi S, Ziv M, Leshem E, Dodiuk-Gad RP. Cutaneous manifestations of COVID-19: Report of three cases and a review of literature. *J Dermatol Sci.* 2020 May;98(2):75-81. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.04.011. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32381430; PMCID: PMC7189855.

Salehi S, Abedi A, Balakrishnan S, Gholamrezanezhad A. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Systematic Review of Imaging Findings in 919 Patients. *AJR Am J Roentgenol.* 2020 Jul;215(1):87-93. doi: 10.2214/AJR.20.23034. Epub 2020 Mar 14. PMID: 32174129.

Sarubbo F, El Haji K, Vidal-Balle A, Bargay Leonart J. Neurological consequences of COVID-19 and brain related pathogenic mechanisms: A new challenge for neuroscience. *Brain Behav Immun Health.* 2022 Feb;19:100399. doi: 10.1016/j.bbih.2021.100399. Epub 2021 Nov 30. PMID: 34870247; PMCID: PMC8629776.

Scaglioni V, Soriano ER. Are superantigens the cause of cytokine storm and viral sepsis in severe COVID-19? Observations and hypothesis. *Scand J Immunol.* 2020 Dec;92(6):e12944. doi: 10.1111/sji.12944. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32697367; PMCID: PMC7404497.

Schuijt TJ, Lankelma JM, Scieluna BP, de Sousa e Melo F, Roelofs JJ, de Boer JD, Hoogendijk AJ, de Beer R, de Vos A, Belzer C, de Vos WM, van der Poll T, Wiersinga WJ.

The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut*. 2016 Apr;65(4):575-83. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309728. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26511795; PMCID: PMC4819612.

Schwartz DA. An Analysis of 38 Pregnant Women With COVID-19, Their Newborn Infants, and Maternal-Fetal Transmission of SARS-CoV-2: Maternal Coronavirus Infections and Pregnancy Outcomes. *Arch Pathol Lab Med*. 2020 Jul 1;144(7):799-805. doi: 10.5858/arpa.2020-0901-SA. PMID: 32180426.

Segars J, Katler Q, McQueen DB, Kotlyar A, Glenn T, Knight Z, Feinberg EC, Taylor HS, Toner JP, Kawwass JF; American Society for Reproductive Medicine Coronavirus/COVID-19 Task Force. Prior and novel coronaviruses, Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), and human reproduction: what is known? *Fertil Steril*. 2020 Jun;113(6):1140-1149. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.04.025. Epub 2020 Apr 16. PMID: 32482250; PMCID: PMC7161522.

Shen Z, Xiao Y, Kang L, Ma W, Shi L, Zhang L, Zhou Z, Yang J, Zhong J, Yang D, Guo L, Zhang G, Li H, Xu Y, Chen M, Gao Z, Wang J, Ren L, Li M. Genomic Diversity of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 28;71(15):713-720. doi: 10.1093/cid/ciaa203. Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2021 Dec 16;73(12):2374. PMID: 32129843; PMCID: PMC7108196.

Sheraton M, Deo N, Kashyap R, Surani S. A Review of Neurological Complications of COVID-19. *Cureus*. 2020 May 18;12(5):e8192. doi: 10.7759/cureus.8192. PMID: 32455089; PMCID: PMC7243063.

Shi S, Qin M, Shen B, Cai Y, Liu T, Yang F, Gong W, Liu X, Liang J, Zhao Q, Huang H, Yang B, Huang C. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol*. 2020 Jul 1;5(7):802-810. doi: 10.1001/jamacardio.2020.0950. PMID: 32211816; PMCID: PMC7097841

Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, Mastellos DC, Metallidis S, Rafailidis P, Ntinopoulou M, Sertaridou E, Tsironidou V, Tsigalou C, Tektonidou M, Konstantinidis T, Papagoras C, Mitroulis I, Germanidis G, Lambris JD, Ritis K. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest*. 2020 Nov 2;130(11):6151-6157. doi: 10.1172/JCI141374. PMID: 32759504; PMCID: PMC7598040.

Smith EC, Sexton NR, Denison MR. Thinking Outside the Triangle: Replication Fidelity of the Largest RNA Viruses. *Annu Rev Virol.* 2014 Nov;1(1):111-32. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085507. Epub 2014 Jun 2. PMID: 26958717.

Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, Chen QX, Gao YW, Zhou HQ, Xiang H, Zheng HJ, Chern SW, Cheng F, Pan CM, Xuan H, Chen SJ, Luo HM, Zhou DH, Liu YF, He JF, Qin PZ, Li LH, Ren YQ, Liang WJ, Yu YD, Anderson L, Wang M, Xu RH, Wu XW, Zheng HY, Chen JD, Liang G, Gao Y, Liao M, Fang L, Jiang LY, Li H, Chen F, Di B, He LJ, Lin JY, Tong S, Kong X, Du L, Hao P, Tang H, Bernini A, Yu XJ, Spiga O, Guo ZM, Pan HY, He WZ, Manuguerra JC, Fontanet A, Danchin A, Niccolai N, Li YX, Wu CI, Zhao GP. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 15;102(7):2430-5. doi: 10.1073/pnas.0409608102. Epub 2005 Feb 4. PMID: 15695582; PMCID: PMC548959.

Speranza E, Williamson BN, Feldmann F, Sturdevant GL, Pérez-Pérez L, Meade-White K, Smith BJ, Lovaglio J, Martens C, Munster VJ, Okumura A, Shaia C, Feldmann H, Best SM, de Wit E. Single-cell RNA sequencing reveals SARS-CoV-2 infection dynamics in lungs of African green monkeys. *Sci Transl Med.* 2021 Jan 27;13(578):eabe8146. doi: 10.1126/scitranslmed.abe8146. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33431511; PMCID: PMC7875333.

Sposito B, Broggi A, Pandolfi L, Crotta S, Clementi N, Ferrarese R, Sisti S, Criscuolo E, Spreafico R, Long JM, Ambrosi A, Liu E, Frangipane V, Saracino L, Bozzini S, Marongiu L, Facchini FA, Bottazzi A, Fossali T, Colombo R, Clementi M, Tagliabue E, Chou J, Pontiroli AE, Meloni F, Wack A, Mancini N, Zanoni I. The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19. *Cell.* 2021 Sep 16;184(19):4953-4968.e16. doi: 10.1016/j.cell.2021.08.016. Epub 2021 Aug 19. PMID: 34492226; PMCID: PMC8373821.

Spudich S, Nath A. Nervous system consequences of COVID-19. *Science.* 2022 Jan 21;375(6578):267-269. doi: 10.1126/science.abm2052. Epub 2022 Jan 20. PMID: 35050660.

Stewart JM, Montgomery LD. Regional blood volume and peripheral blood flow in postural tachycardia syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Sep;287(3):H1319-27. doi: 10.1152/ajpheart.00086.2004. Epub 2004 Apr 29. PMID: 15117717; PMCID: PMC4515760.

Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, Yi F, Yang HC, Fogo AB, Nie X, Zhang C. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int.* 2020 Jul;98(1):219-227. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.003. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32327202; PMCID: PMC7194105.

Su S, Cui H, Wang T, Shen X, Ma C. Pain: A potential new label of COVID-19. *Brain Behav Immun.* 2020 Jul;87:159-160. doi: 10.1016/j.bbi.2020.05.025. Epub 2020 May 7. PMID: 32389704; PMCID: PMC7204693.

Sudre CH, Murray B, Varsavsky T, Graham MS, Penfold RS, Bowyer RC, Pujol JC, Klaser K, Antonelli M, Canas LS, Molteni E, Modat M, Jorge Cardoso M, May A, Ganesh S, Davies R, Nguyen LH, Drew DA, Astley CM, Joshi AD, Merino J, Tsereteli N, Fall T, Gomez MF, Duncan EL, Menni C, Williams FMK, Franks PW, Chan AT, Wolf J, Ourselin S, Spector T, Steves CJ. Attributes and predictors of long COVID. *Nat Med.* 2021 Apr;27(4):626-631. doi: 10.1038/s41591-021-01292-y. Epub 2021 Mar 10. Erratum in: *Nat Med.* 2021 Jun;27(6):1116. PMID: 33692530; PMCID: PMC7611399.

Sun B, Tang N, Peluso MJ, Iyer NS, Torres L, Donatelli JL, Munter SE, Nixon CC, Rutishauser RL, Rodriguez-Barraquer I, Greenhouse B, Kelly JD, Martin JN, Deeks SG, Henrich TJ, Pulliam L. Characterization and Biomarker Analyses of Post-COVID-19 Complications and Neurological Manifestations. *Cells.* 2021 Feb 13;10(2):386. doi: 10.3390/cells10020386. PMID: 33668514; PMCID: PMC7918597.

Suwanwongse K, Shabarek N. Rhabdomyolysis as a Presentation of 2019 Novel Coronavirus Disease. *Cureus.* 2020 Apr 6;12(4):e7561. doi: 10.7759/cureus.7561. PMID: 32382463; PMCID: PMC7202588.

Tan DX, Reiter RJ. Mechanisms and clinical evidence to support melatonin's use in severe COVID-19 patients to lower mortality. *Life Sci.* 2022 Apr 1;294:120368. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120368. Epub 2022 Jan 30. PMID: 35108568; PMCID: PMC8800937.

Tanni SE, Fabro AT, de Albuquerque A, Ferreira EVM, Verrastro CGY, Sawamura MVY, Ribeiro SM, Baldi BG. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a narrative review. *Expert Rev Respir Med.* 2021 Jun;15(6):791-803. doi: 10.1080/17476348.2021.1916472. Epub 2021 Apr 27. PMID: 33902377.

Taquet M, Sillett R, Zhu L, Mendel J, Camplisson I, Dercon Q, Harrison PJ. Neurological and psychiatric risk trajectories after SARS-CoV-2 infection: an analysis of 2-year retrospective cohort studies including 1 284 437 patients. *Lancet Psychiatry*. 2022 Oct;9(10):815-827. doi: 10.1016/S2215-0366(22)00260-7. Epub 2022 Aug 17. PMID: 35987197; PMCID: PMC9385200.

Tavakolpour S, Rakhshandehroo T, Wei EX, Rashidian M. Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned. *Immunol Lett*. 2020 Sep;225:31-32. doi: 10.1016/j.imlet.2020.06.013. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32569607; PMCID: PMC7305732.

Tian Y, Rong L, Nian W, He Y. Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020 May;51(9):843-851. doi: 10.1111/apt.15731. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32222988; PMCID: PMC7161803.

Torales J, O'Higgins M, Castaldelli-Maia JM, Ventriglio A. The outbreak of COVID-19 coronavirus and its impact on global mental health. *Int J Soc Psychiatry*. 2020 Jun;66(4):317-320. doi: 10.1177/0020764020915212. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32233719.

Torjesen I. Covid-19: Delta variant is now UK's most dominant strain and spreading through schools. *BMJ*. 2021 Jun 4;373:n1445. doi: 10.1136/bmj.n1445. PMID: 34088699.

Townsend L, Dyer AH, Jones K, Dunne J, Mooney A, Gaffney F, O'Connor L, Leavy D, O'Brien K, Dowds J, Sugrue JA, Hopkins D, Martin-Loeches I, Ni Cheallaigh C, Nadarajan P, McLaughlin AM, Bourke NM, Bergin C, O'Farrelly C, Bannan C, Conlon N. Persistent fatigue following SARS-CoV-2 infection is common and independent of severity of initial infection. *PLoS One*. 2020 Nov 9;15(11):e0240784. doi: 10.1371/journal.pone.0240784. PMID: 33166287; PMCID: PMC7652254.

Turner S, Khan MA, Putrino D, Woodcock A, Kell DB, Pretorius E. Long COVID: pathophysiological factors and abnormalities of coagulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2023 Jun;34(6):321-344. doi: 10.1016/j.tem.2023.03.002. Epub 2023 Apr 19. PMID: 37080828; PMCID: PMC10113134.

Unterman A, Sumida TS, Nouri N, Yan X, Zhao AY, Gasque V, Schupp JC, Asashima H, Liu Y, Cosme C Jr, Deng W, Chen M, Raredon MSB, Hoehn KB, Wang G, Wang Z, DeJuliis G, Ravindra NG, Li N, Castaldi C, Wong P, Fournier J, Bermejo S, Sharma L,

Casanovas-Massana A, Vogels CBF, Wyllie AL, Grubaugh ND, Melillo A, Meng H, Stein Y, Minasyan M, Mohanty S, Ruff WE, Cohen I, Raddassi K; Yale IMPACT Research Team; Niklason LE, Ko AI, Montgomery RR, Farhadian SF, Iwasaki A, Shaw AC, van Dijk D, Zhao H, Kleinstein SH, Hafler DA, Kaminski N, Dela Cruz CS. Single-cell multi-omics reveals dyssynchrony of the innate and adaptive immune system in progressive COVID-19. *Nat Commun.* 2022 Jan 21;13(1):440. doi: 10.1038/s41467-021-27716-4. PMID: 35064122; PMCID: PMC8782894.

van Campen CLMC, Verheugt FWA, Rowe PC, Visser FC. Cerebral blood flow is reduced in ME/CFS during head-up tilt testing even in the absence of hypotension or tachycardia: A quantitative, controlled study using Doppler echography. *Clin Neurophysiol Pract.* 2020 Feb 8;5:50-58. doi: 10.1016/j.cnp.2020.01.003. PMID: 32140630; PMCID: PMC7044650.

Vanderheiden A, Klein RS. Neuroinflammation and COVID-19. *Curr Opin Neurobiol.* 2022 Oct;76:102608. doi: 10.1016/j.conb.2022.102608. Epub 2022 Jun 29. PMID: 35863101; PMCID: PMC9239981.

Vernino S, Bourne KM, Stiles LE, Grubb BP, Fedorowski A, Stewart JM, Arnold AC, Pace LA, Axelsson J, Boris JR, Moak JP, Goodman BP, Chémali KR, Chung TH, Goldstein DS, Diedrich A, Miglis MG, Cortez MM, Miller AJ, Freeman R, Biaggioni I, Rowe PC, Sheldon RS, Shibao CA, Systrom DM, Cook GA, Doherty TA, Abdallah HI, Darbari A, Raj SR. Postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS): State of the science and clinical care from a 2019 National Institutes of Health Expert Consensus Meeting - Part 1. *Auton Neurosci.* 2021 Nov;235:102828. doi: 10.1016/j.autneu.2021.102828. Epub 2021 Jun 5. PMID: 34144933; PMCID: PMC8455420.

Viana R, Moyo S, Amoako DG, Tegally H, Scheepers C, Althaus CL, Anyaneji UJ, Bester PA, Boni MF, Chand M, Choga WT, Colquhoun R, Davids M, Deforche K, Doolabh D, du Plessis L, Engelbrecht S, Everatt J, Giandhari J, Giovanetti M, Hardie D, Hill V, Hsiao NY, Iranzadeh A, Ismail A, Joseph C, Joseph R, Koopile L, Kosakovsky Pond SL, Kraemer MUG, Kuate-Lere L, Laguda-Akingba O, Lesetedi-Mafoko O, Lessells RJ, Lockman S, Lucaci AG, Maharaj A, Mahlangu B, Maponga T, Mahlakwane K, Makatini Z, Marais G, Maruapula D, Masupu K, Matshaba M, Mayaphi S, Mbhele N, Mbulawa MB, Mendes A, Mlisana K, Mnguni A, Mohale T, Moir M, Moruisi K, Mosepele M, Motsatsi G, Motswaledi MS, Mphoyakgosi T, Msomi N, Mwangi PN, Naidoo Y, Ntuli N, Nyaga M, Olubayo L, Pillay S, Radibe B, Ramphal Y, Ramphal U, San JE, Scott L, Shapiro R, Singh L, Smith-Lawrence P, Stevens W, Strydom A, Subramoney K, Tebeila N, Tshiabuila D, Tsui J, van

Wyk S, Weaver S, Wibmer CK, Wilkinson E, Wolter N, Zarebski AE, Zuze B, Goedhals D, Preiser W, Treurnicht F, Venter M, Williamson C, Pybus OG, Bhiman J, Glass A, Martin DP, Rambaut A, Gaseitsiwe S, von Gottberg A, de Oliveira T. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature*. 2022 Mar;603(7902):679-686. doi: 10.1038/s41586-022-04411-y. Epub 2022 Jan 7. PMID: 35042229; PMCID: PMC8942855.

Vila Muntadas M, Agustí Sunyer I, Agustí Garcia-Navarro A. COVID-19 diagnostic tests: Importance of the clinical context. *Med Clin (Engl Ed)*. 2021 Aug 27;157(4):185-190. doi: 10.1016/j.medcle.2021.03.008. Epub 2021 Jul 31. PMID: 34368460; PMCID: PMC8324468.

Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, Hinsley WR, Laydon DJ, Dabrera G, O'Toole Á, Amato R, Ragonnet-Cronin M, Harrison I, Jackson B, Ariani CV, Boyd O, Loman NJ, McCrone JT, Gonçalves S, Jorgensen D, Myers R, Hill V, Jackson DK, Gaythorpe K, Groves N, Sillitoe J, Kwiatkowski DP; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium; Flaxman S, Ratmann O, Bhatt S, Hopkins S, Gandy A, Rambaut A, Ferguson NM. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*. 2021 May;593(7858):266-269. doi: 10.1038/s41586-021-03470-x. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33767447.

Wacharapluesadee S, Tan CW, Maneern P, Duengkae P, Zhu F, Joyjinda Y, Kaewpom T, Chia WN, Ampoot W, Lim BL, Worachotsueptrakun K, Chen VC, Sirichan N, Ruchisrisarod C, Rodpan A, Noradechanon K, Phaichana T, Jantararat N, Thongnumchaima B, Tu C, Cramer G, Stokes MM, Hemachudha T, Wang LF. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat Commun*. 2021 Feb 9;12(1):972. doi: 10.1038/s41467-021-21240-1. Erratum in: *Nat Commun*. 2021 Feb 25;12(1):1430. PMID: 33563978; PMCID: PMC7873279.

Wahidi MM, Lamb C, Murgu S, Musani A, Shojaee S, Sachdeva A, Maldonado F, Mahmood K, Kinsey M, Sethi S, Mahajan A, Majid A, Keyes C, Alraiyes AH, Sung A, Hsia D, Eapen G. American Association for Bronchology and Interventional Pulmonology (AABIP) Statement on the Use of Bronchoscopy and Respiratory Specimen Collection in Patients With Suspected or Confirmed COVID-19 Infection. *J Bronchology Interv Pulmonol*. 2020 Oct;27(4):e52-e54. doi: 10.1097/LBR.0000000000000681. PMID: 32195687; PMCID: PMC7141581.

Wallukat G, Hohberger B, Wenzel K, Fürst J, Schulze-Rothe S, Wallukat A, Hönicke AS, Müller J. Functional autoantibodies against G-protein coupled receptors in patients with persistent Long-COVID-19 symptoms. *J Transl Autoimmun.* 2021;4:100100. doi: 10.1016/j.jtauto.2021.100100. Epub 2021 Apr 16. PMID: 33880442; PMCID: PMC8049853.

Wang C, Yu C, Jing H, Wu X, Novakovic VA, Xie R, Shi J. Long COVID: The Nature of Thrombotic Sequelae Determines the Necessity of Early Anticoagulation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Apr 5;12:861703. doi: 10.3389/fcimb.2022.861703. PMID: 35449732; PMCID: PMC9016198.

Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, Cheng Z, Xiong Y, Zhao Y, Li Y, Wang X, Peng Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020 Mar 17;323(11):1061-1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585. Erratum in: *JAMA.* 2021 Mar 16;325(11):1113. PMID: 32031570; PMCID: PMC7042881.

Wang F, Kream RM, Stefano GB. Long-Term Respiratory and Neurological Sequelae of COVID-19. *Med Sci Monit.* 2020 Nov 1;26:e928996. doi: 10.12659/MSM.928996. PMID: 33177481; PMCID: PMC7643287.

Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, Liu J. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Sep;39(9):1629-1635. doi: 10.1007/s10096-020-03899-4. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32333222; PMCID: PMC7180649.

Weinstock LB, Brook JB, Walters AS, Goris A, Afrin LB, Molderings GJ. Mast cell activation symptoms are prevalent in Long-COVID. *Int J Infect Dis.* 2021 Nov;112:217-226. doi: 10.1016/j.ijid.2021.09.043. Epub 2021 Sep 23. PMID: 34563706; PMCID: PMC8459548.

Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, Heinrich F, Mushumba H, Kniep I, Schröder AS, Burdelski C, de Heer G, Nierhaus A, Frings D, Pfefferle S, Becker H, Brederke-Wiedling H, de Weerth A, Paschen HR, Sheikhzadeh-Eggers S, Stang A, Schmiedel S, Bokemeyer C, Addo MM, Aepfelbacher M, Püschel K, Kluge S. Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19: A

Prospective Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2020 Aug 18;173(4):268-277. doi: 10.7326/M20-2003. Epub 2020 May 6. PMID: 32374815; PMCID: PMC7240772.

Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, Niemeyer D, Jones TC, Vollmar P, Rothe C, Hoelscher M, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Ehmann R, Zwirgmaier K, Drosten C, Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020 May;581(7809):465-469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x. Epub 2020 Apr 1. Erratum in: *Nature.* 2020 Dec;588(7839):E35. PMID: 32235945.

Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020 Mar;579(7798):265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3. Epub 2020 Feb 3. Erratum in: *Nature.* 2020 Apr;580(7803):E7. PMID: 32015508; PMCID: PMC7094943.

Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020 Apr 7;323(13):1239-1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648. PMID: 32091533.

Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, Warren JL, Geng B, Muenker MC, Moore AJ, Vogels CBF, Petrone ME, Ott IM, Lu P, Venkataraman A, Lu-Culligan A, Klein J, Earnest R, Simonov M, Datta R, Handoko R, Naushad N, Sewanan LR, Valdez J, White EB, Lapidus S, Kalinich CC, Jiang X, Kim DJ, Kudo E, Linehan M, Mao T, Moriyama M, Oh JE, Park A, Silva J, Song E, Takahashi T, Taura M, Weizman OE, Wong P, Yang Y, Bermejo S, Odio CD, Omer SB, Dela Cruz CS, Farhadian S, Martinello RA, Iwasaki A, Grubaugh ND, Ko AI. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* 2020 Sep 24;383(13):1283-1286. doi: 10.1056/NEJMc2016359. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32857487; PMCID: PMC7484747.

Xie Y, Al-Aly Z. Risks and burdens of incident diabetes in long COVID: a cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2022 May;10(5):311-321. doi: 10.1016/S2213-8587(22)00044-4. Epub 2022 Mar 21. PMID: 35325624; PMCID: PMC8937253.

Xie Y, Xu E, Bowe B, Al-Aly Z. Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19. *Nat Med.* 2022 Mar;28(3):583-590. doi: 10.1038/s41591-022-01689-3. Epub 2022 Feb 7. PMID: 35132265; PMCID: PMC8938267.

Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Li T, Chen Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020 Feb 24;12(1):8. doi: 10.1038/s41368-020-0074-x. PMID: 32094336; PMCID: PMC7039956.

Ye Z, Zhang Y, Wang Y, Huang Z, Song B. Chest CT manifestations of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review. *Eur Radiol.* 2020 Aug;30(8):4381-4389. doi: 10.1007/s00330-020-06801-0. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32193638; PMCID: PMC7088323.

Yeoh YK, Zuo T, Lui GC, Zhang F, Liu Q, Li AY, Chung AC, Cheung CP, Tso EY, Fung KS, Chan V, Ling L, Joynt G, Hui DS, Chow KM, Ng SSS, Li TC, Ng RW, Yip TC, Wong GL, Chan FK, Wong CK, Chan PK, Ng SC. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut.* 2021 Apr;70(4):698-706. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323020. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33431578; PMCID: PMC7804842.

Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases. *J Inflamm Res.* 2014 May 29;7:69-87. doi: 10.2147/JIR.S63898. PMID: 24971027; PMCID: PMC4070857.

Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis (Lond).* 2021 Oct;53(10):737-754. doi: 10.1080/23744235.2021.1924397. Epub 2021 May 22. PMID: 34024217; PMCID: PMC8146298.

Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron.* 2021 Jan 15;172:112752. doi: 10.1016/j.bios.2020.112752. Epub 2020 Oct 24. PMID: 33126180; PMCID: PMC7584564.

Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol.* 2020 Jun;215:108427. doi: 10.1016/j.clim.2020.108427. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32325252; PMCID: PMC7169933.

Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020

Mar;579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7. Epub 2020 Feb 3. Erratum in: Nature. 2020 Dec;588(7836):E6. PMID: 32015507; PMCID: PMC7095418.

Zhou Y, Han T, Chen J, Hou C, Hua L, He S, Guo Y, Zhang S, Wang Y, Yuan J, Zhao C, Zhang J, Jia Q, Zuo X, Li J, Wang L, Cao Q, Jia E. Clinical and Autoimmune Characteristics of Severe and Critical Cases of COVID-19. Clin Transl Sci. 2020 Nov;13(6):1077-1086. doi: 10.1111/cts.12805. Epub 2020 May 14. PMID: 32315487; PMCID: PMC7264560.

Zhou Z, Kang H, Li S, Zhao X. Understanding the neurotropic characteristics of SARS-CoV-2: from neurological manifestations of COVID-19 to potential neurotropic mechanisms. J Neurol. 2020 Aug;267(8):2179-2184. doi: 10.1007/s00415-020-09929-7. Epub 2020 May 26. PMID: 32458193; PMCID: PMC7249973.

Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020 Feb 20;382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017. Epub 2020 Jan 24. PMID: 31978945; PMCID: PMC7092803.

Zollner A, Koch R, Jukic A, Pfister A, Meyer M, Rössler A, Kimpel J, Adolph TE, Tilg H. Postacute COVID-19 is Characterized by Gut Viral Antigen Persistence in Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology. 2022 Aug;163(2):495-506.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2022.04.037. Epub 2022 May 1. PMID: 35508284; PMCID: PMC9057012.

Zuo MZ, Huang YG, Ma WH, Xue ZG, Zhang JQ, Gong YH, Che L; Chinese Society of Anesthesiology Task Force on Airway Management; Airway Management Chinese Society of Anesthesiology Task Force on. Expert Recommendations for Tracheal Intubation in Critically ill Patients with Noval Coronavirus Disease 2019. Chin Med Sci J. 2020 Feb 27;35(2):105–9. doi: 10.24920/003724. Epub ahead of print. PMID: 32102726; PMCID: PMC7367670.

Zuo T, Zhang F, Lui GCY, Yeoh YK, Li AYL, Zhan H, Wan Y, Chung ACK, Cheung CP, Chen N, Lai CKC, Chen Z, Tso EYK, Fung KSC, Chan V, Ling L, Joynt G, Hui DSC, Chan FKL, Chan PKS, Ng SC. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. Gastroenterology. 2020 Sep;159(3):944-955.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2020.05.048. Epub 2020 May 20. PMID: 32442562; PMCID: PMC7237927.

V. RINGRAZIAMENTI

Sopporta, cuore. Chissà se, finalmente tornato ad Itaca, Ulisse si sentiva così, con l'anima a metà contesa tra ragione e sentimento, l'eterno dissidio dove la mente cerca di domare il cuore dopo aver affrontato il viaggio di ritorno in patria, il “*nostos*” (νόστος) che plasma la nostalgia intrisa di quella sofferenza, “*algos*” (ἄλγος), provocata dal desiderio inappagato di ritornare. Ed è così che la sofferenza sembra essere quasi funzionale al viaggio stesso, il cuore deve necessariamente sopportare, resistere per ri-esistere.

Il mio viaggio, o meglio, il mio “*nostos*”, è iniziato proprio così. Con l'anima divisa a metà tra poesia e scienza e un cuore ancora poco allenato a “sopportare”. Forgiata dalla mia formazione classica, ho iniziato il mio percorso nel mondo medico ripromettendomi che vi avrei sempre trovato la poesia e in effetti così è stato sin dal principio, sin dal momento della scelta della più umanistica delle scienze, l'arte medica, connubio tra *humanitas* e ragione.

Quando ho iniziato questo viaggio, sono salita su un aereo e mi sono tuffata nel vuoto. Ed è stato realmente così. Tirana è stata il mio nido, la “terra delle aquile” mi ha dato le sue ali e mi ha permesso di sognare. Eppure ho dovuto intraprendere sentieri intricati prima di imparare a volare, imparare a dipanare la matassa del destino seguendo il filo rosso nel labirinto del tempo. Sì, perché troppo spesso ci si ritrova smarriti in un tempo che non è il proprio, ma questo viaggio mi ha insegnato a capire l'importanza del proprio tempo e attribuirgli un valore, perché “è il tempo che hai perduto per la tua rosa che ha reso la tua rosa così importante”. A volte le strade del mio labirinto erano davvero buie, altre volte si sono trasformate in fiumi vorticosi che mi hanno travolta e quasi risucchiata, annullata. Il mare era davvero un sogno lontano, ma, nonostante tutto, ho avuto le giuste guide attorno a me e porti sicuri a cui approdare.

La mia guida è stata la Professoressa Annalisa Noce, mentore del mio “*nostos*”, che sempre ringrazierò per essere stata una luce importante in questi ultimi tre anni. Lei ha saputo tendermi una mano e credere in me, aiutandomi ad orientarmi lungo la strada. Con lei sono cresciuta e ho potuto conoscere da vicino l'arte medica, ho imparato cosa significa amare incondizionatamente il proprio lavoro, ma

soprattutto ringrazierò sempre la Professoressa per avermi trasmesso il valore dell'empatia, perché i pazienti sono prima di tutto persone, ciascuno con la propria storia, disperate, sole, malate, ma persone. Non so ancora cosa mi riserverà il futuro, ma spero di riuscire, sempre, a “sentire” il paziente, proprio come suggerisce l'etimologia della parola “empatia”, “sentire dentro”, avere accesso al mondo interiore del paziente e mettersi nei suoi panni per poter prendersi cura di lui in maniera totalizzante.

*“Se io potrò impedire a un cuore di spezzarsi
non avrò vissuto invano
Se allevierò il dolore di una vita
o guarirò una pena
o aiuterò un pettirosso caduto
a rientrare nel nido
non avrò vissuto invano”
(Emily Dickinson)*

La mia Professoressa mi ha insegnato proprio questo e per me lei sempre sarà un modello da seguire. È per incontri come questi che sono grata al mio viaggio, un cammino che mi ha dato la possibilità di conoscere delle belle anime: oltre alla Professoressa, anche le sue collaboratrici, dei veri porti sicuri.

La Dott.ssa Giulia è stata un punto di riferimento prezioso nella stesura del mio lavoro di tesi. La sua disponibilità è stata, per me, inestimabile, unitamente alla sua comprensione. Sempre precisa e attenta, non dimenticherò mai la sua professionalità intrisa di dolcezza e gentilezza. Nonostante i tanti impegni, non mi ha mai abbandonata e si è ricordata di me sempre, specialmente nei momenti in cui anche una semplice rassicurazione era fondamentale.

La Dott.ssa Manuela è stata un aiuto indispensabile nella gestione organizzativa del mio lavoro di tesi. Sempre al mio fianco negli ultimi tre anni, non mi ha mai lasciata sola. Sentivo di poter contare sul suo aiuto ogni volta e, in effetti, è stato così: sempre pronta ad offrirmi il suo sostegno con la precisione e l'efficienza che la contraddistinguono.

La Dott.ssa Cristina è stata una persona speciale che mi ha sostenuta non solo nel mio lavoro di tesi, ma è stata anche una figura importante poiché mi ha aiutata a ritrovare la strada quando mi sentivo persa nel mio labirinto interiore. Lei è stata la mano tesa di cui avevo bisogno, una professionista così empatica tant'è che le è bastato uno sguardo per capirmi, e per questo la porterò sempre nel cuore.

Ringrazio anche la Dott.ssa Claudia per il suo supporto che non è mai mancato in questi anni, tra una risata e l'altra.

Se è vero che non incrociamo mai delle persone per caso lungo la strada, quelle che ho incontrato io hanno lasciato un'impronta profonda nel mio viaggio. Mi hanno aiutata a correre e a perseguire i miei obiettivi. Spero di aver lasciato anch'io in loro qualcosa di buono, anche solo un ricordo, come loro hanno fatto con me.

Il mio “*nostos*” è stato molto lungo, ma non ho viaggiato da sola. Le mie compagne di viaggio sono state Shadey e Cristina: sono state la conferma del fatto che certi percorsi non si fanno mai da soli, alcune strade sono troppo impervie, talvolta è necessario, quasi vitale, camminare insieme. Con loro ho imparato il senso della condivisione, della compassione, nel vero e proprio senso del termine, “soffrire insieme”, forse perché ci siamo conosciute nel momento più buio per tutte, quando pensavamo che la fine non sarebbe mai arrivata, e questo ci ha unite. Ricordo ancora quando, con gli occhi sognanti, guardavamo gli altri festeggiare le loro lauree e all'epoca ci sembrava un traguardo che non ci appartenesse. Eppure è stato proprio quel periodo difficile a farci conoscere. E, così, ci siamo sostenute a vicenda, camminando insieme fino alla fine. Cristina, da collega ad amica, un legame suggellato dalla condivisione di ogni singolo momento di questo percorso, di ogni ansia, di ogni paura. Camminare insieme è stato vitale anche quando dovevamo tenerci per mano virtualmente attraverso uno schermo, quando la pandemia ci divideva fisicamente. Condividere tutte le difficoltà affrontate ci ha rafforzato, grazie perché ho sempre sentito di poter contare su di te e sulla tua generosità disinteressata. Shadey: il nostro primo incontro non lo dimenticheremo mai, eppure, da allora, abbiamo condiviso tutto. Ci siamo tenute per mano sempre, abbiamo gioito e pianto, ci siamo sempre state l'una per l'altra, abbiamo imparato a correre insieme. Quell'incontro fortuito ci ha legate e ci ha permesso di affrontare ogni asperità lungo la strada, ogni respiro, ogni ansia. Non dimenticherò mai il tuo

sostegno fino all'ultimo esame, quando, entrambe con gli occhi gonfi di gioia, avevamo capito di avercela fatta. È stato proprio così, *“per aspera ad astra”*, il cielo stellato ora ci illumina, anche oggi condividiamo questo traguardo, insieme fino alla fine.

Qualcuno diceva che sarebbe davvero bello se, per ogni mare che ci aspetta, ci fosse un fiume per noi, e qualcuno capace di prenderci per mano e di trovare quel fiume, di immaginarlo, di inventarlo e di posarci sulla sua corrente con leggerezza. La vita sarebbe dolce e le cose farebbero meno male, e si avvicinerrebbero a noi portate dalla corrente, si potrebbe prima sfiorarle e poi toccarle e solo alla fine farsi toccare. Basterebbe la fantasia di qualcuno, un padre, una madre, un amore, qualcuno che saprebbe inventare una strada. La mia famiglia è stata la mia strada da qui al mare. Questo viaggio non sarebbe stato possibile senza la loro luce, sono state le mie stelle. Mio fratello Vincenzo, brilli di bontà, ti ringrazio per essere stato semplicemente te stesso, sostenendomi in questi anni nel silenzio della distanza. Ogni giorno mi insegni l'arte della gentilezza, la tua bontà è un dono, non lasciarti mai scalfire l'anima. Anche se i nostri rami vanno in direzioni diverse, le nostre radici saranno sempre legate, ed è proprio così: non mi sento mai sola perché so che potremo sempre contare l'un l'altro.

Mia madre, il mio sole, con la tua luce avvolgente e amorevole hai riscaldato le giornate più fredde di questo viaggio e accarezzato il mio cuore quando avevo semplicemente bisogno che qualcuno mi tenesse per mano, perché e a volte ci serve solo scioglierci in un abbraccio. La tua luce è stata vitale e mi ha indicato la strada sempre, anche quando pensavo di non avere più forze. Per questi anni, le tue braccia hanno sempre continuato a cullarmi ed è per questo che in ogni istante mi sono sentita protetta nel tepore della tenerezza, sei stata calore e supporto.

E, infine, mio padre. Senza di te nulla sarebbe stato possibile, hai condiviso con me ogni attimo, ogni silenzio, ogni respiro, ogni sguardo, ogni paura, dall'inizio alla fine, dal primo all'ultimissimo esame. Hai preso sulle sue spalle ogni mia ansia per alleggerire tutti i miei carichi, come quando da bambina venivi a prendermi a scuola e mi portavi lo zaino. Hai portato tutte le “valigie” emotive del mio viaggio. Sei il medico più bravo che conosca, e spero, un giorno, di diventare come te. Mi dicevi sempre di guardare avanti, di guardare la stella: la mia stella polare sei stata tu.

Adesso che sono arrivata alla fine della strada, il mare si apre davanti a me. La mia Itaca è qui, la matassa del destino è dipanata e il filo rosso mi ha mostrato l'uscita di quel labirinto che, negli anni, era diventata la mia fortezza. Mi accorgo di aver viaggiato dentro me stessa, mi rendo conto che il mio "*nostos*" è un ritorno, che la meta sono io: sono tornata a casa, ma allo stesso tempo sono un'altra persona, fortificata da quel desiderio sofferto per ritrovare la mia patria, per ritrovare me stessa, la mia Itaca. Un luogo senza spazio, con il mio tempo, orientato dall'inclinazione delle stelle. Un luogo che si può sentire, ma solo continuando a viaggiare perché "il più bello dei mari è quello che non navigammo" e anche perché "quando ti metterai in viaggio per Itaca, devi augurarti che la strada sia lunga". La mia lo è stata davvero. Ho corso per molti giorni costeggiando una muraglia forgiata dal tempo, trincea e rifugio che silenziosamente si ergeva attorno a me. Adesso il sentiero sembra sciogliersi nel fuoco del tramonto, tuffarsi nel vuoto a trafiggere l'orizzonte, e tutti quei mattoni di certezze incastrati tra le mura si sgretolano dentro le ombre del passato, per lasciare che la strada si faccia cielo, per lasciare che la corsa si faccia volo.