



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze del Farmaco

Corso di laurea magistrale in Farmacia (D.M. 270/04)

Tesi di Laurea

Lattoferrina e SARS-CoV-2: quali meccanismi e studi supportano una sua potenziale utilità?

Relatore

Ch. mo Prof. Stefano Dall'Acqua

Laureando

Matteo Corrò

Matricola: 1141357

Anno Accademico 2021-2022

Un ringraziamento speciale va innanzitutto alla mia famiglia, in particolare Papà Valter e Mamma Roberta, per avermi sempre sostenuto in questo lungo percorso di studi e di vita.

È grazie a voi se tutto questo è stato possibile.

Ringrazio immensamente Silvia, la mia fidanzata, per aver sempre creduto in me e per non aver mai smesso di dimostrarmi tutto il suo affetto.

Grazie di cuore.

Ringrazio i miei amici che mi hanno accompagnato in questo percorso, aiutandomi a superarne i numerosi ostacoli.

Ringrazio infine il mio relatore, il Professore Stefano Dall'Acqua, per il suo contributo nella redazione della tesi.

SOMMARIO

Sono ormai più di due anni che la pandemia di COVID-19 è entrata nelle nostre vite, cambiando le nostre abitudini e stili di vita. L’impatto che il virus ha avuto, e continua ad avere, sulla nostra salute, sulla nostra economia e sulla nostra società è drammatico. Il COVID-19 ha influito molto sia sulla salute fisica sia su quella mentale dei cittadini di tutte le età, complici anche le numerose restrizioni e *lock-down*.

Sin dall’inizio della pandemia tutti gli Stati si sono mossi e coordinati allo scopo di ottenere terapie per contrastare o prevenire l’infezione virale. Tuttavia, non esiste ancora un buon trattamento farmacologico efficace per il COVID-19. Per questa ragione potrebbe essere utile identificare terapie di supporto in grado di stabilizzare il sistema immunitario e aiutare ad affrontare l’infezione.

A diversi integratori alimentari e cosiddetti “nutraceutici” sono attribuite capacità di rinforzo del sistema immunitario, antiossidanti e azioni riferibili a proprietà antinfiammatorie che potrebbero essere di aiuto nei regimi di terapia o prevenzione contro il SARS-CoV-2. Tra questi ritroviamo lo zinco, la vitamina D, la vitamina C, i probiotici, il selenio e la lattoferrina. Quest’ultima è una glicoproteina con numerose proprietà, derivanti da diversi studi che ne hanno considerato azioni antimicrobiche e immunologiche. I numerosi dati già presenti in letteratura hanno fornito la base di partenza per sperimentazioni sul possibile utilizzo della lattoferrina nella terapia contro il COVID-19.

In questa tesi vengono esaminati gli studi effettuati in questi due anni di pandemia. I risultati ottenuti sono piuttosto concordi nell’affermare che la lattoferrina potrebbe rivestire un ruolo importante nel contrastare l’infezione da SARS-CoV-2. Ulteriori studi su popolazioni più ampie sono però necessari per confermare l’efficacia del trattamento con questa sostanza.

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. IL COVID-19	3
1.1. Il virus SARS-CoV-2	3
1.2. Infezione da SARS-CoV-2.....	5
2. GLI INTEGRATORI ALIMENTARI COME SUPPORTO PREVENTIVO E TERAPEUTICO CONTRO IL COVID-19	11
2.1. Come possono gli integratori essere utili contro il COVID-19?	11
2.2. Sostanze presenti negli integratori che potrebbero avere una possibile utilità contro il COVID-19	13
3. LA LATTOFERRINA: PROPRIETA' TERAPEUTICHE E MECCANISMI ALLA BASE DELLE SUE MOLTEPLICI ATTIVITA'	21
3.1. La lattoferrina: caratteristiche strutturali	21
3.2. Produzione e localizzazione della lattoferrina.....	22
3.3. Legame tra struttura e attività	25
3.4. Proprietà della lattoferrina: aspetti generali.....	26
3.4.1. Attività Antibatterica	27
3.4.2. Attività Antinfiammatoria e Immunomodulatoria	29
3.4.3. Attività Antivirale	30
4. STUDI DEI POTENZIALI EFFETTI DELLA LATTOFERRINA NEL CONTRASTARE IL COVID-19	35

4.1. Studi <i>in vitro</i>	36
4.2. Studi <i>in vivo</i>	39
CONCLUSIONI	47
BIBLIOGRAFIA	49
SITOGRAFIA	67

INTRODUZIONE

A livello globale la pandemia di COVID-19 si è diffusa rapidamente e ha avuto un enorme impatto sulla salute pubblica, con morbilità e mortalità sostanziali.

La ricerca di nuove terapie antivirali efficaci prosegue senza sosta. Attualmente, sono stati sviluppati diversi tipi di vaccini per il COVID-19, come il vaccino a base di mRNA e il vaccino a vettore virale. Le terapie primarie per curare la malattia rimangono gli antivirali e gli antinfiammatori.

Oltre ai vaccini, vi è una significativa necessità di terapie efficaci nella fase iniziale o di infezione lieve, poiché i benefici immediati di tali strategie potrebbero portare al miglioramento degli esiti dei pazienti e alla prevenzione del ricovero ospedaliero e, a lungo termine, possono implicare la prevenzione delle conseguenze croniche dell'infezione e il controllo della trasmissione virale, riducendo il periodo di infettività.

Si è visto poi che un'importante strategia per il controllo e il trattamento del COVID-19 consiste nel modulare il sistema immunitario utilizzando vari metodi come la terapia con plasma iperimmune, la soppressione delle citochine infiammatorie, gli inibitori delle chinasi, le terapie cellulari, la terapia del complemento e la terapia con anticorpi monoclonali (Shen *et al.*, 2022).

Ad oggi però non ci sono ancora delle terapie efficaci approvate per combattere il virus, e lo sviluppo di nuovi antivirali è una grande sfida che richiede molto tempo per la progettazione e la convalida. Pertanto, l'esplorazione del riutilizzo dei composti naturali potrebbe fornire una possibile valida alternativa contro il COVID-19.

Diversi prodotti appartenenti alla categoria degli integratori alimentari, spesso comunemente indicati come nutraceutici, presentano *claim* che coinvolgono il rinforzo del sistema immunitario e antiossidante. Questi includono lo zinco, la vitamina D, la vitamina C, i probiotici, il selenio e lattoferrina. Tali nutrienti potrebbero essere utilizzati per mitigare gli effetti patologici indotti dall'infezione da SARS-CoV-2 e fornire un supporto profilattico e terapeutico alternativo durante la terapia per il COVID-19.

Tra questi, la lattoferrina ha suscitato un notevole interesse nella comunità scientifica durante la pandemia ed è stata oggetto di un numero abbastanza ragguardevole di studi.

La lattoferrina è una glicoproteina presente nel latte dei mammiferi con proprietà antimicrobiche. L'integrazione con lattoferrina è associata ad un effetto preventivo contro lo sviluppo di diverse infezioni virali, agendo sull'adesione e replicazione virale, importante nel controllo della prima fase del processo infettivo. Oltre all'attività antimicrobica, la lattoferrina svolge un significativo effetto antinfiammatorio e immunomodulatore.

L'obiettivo della tesi è quello di analizzare le informazioni presenti in letteratura scientifica sul possibile effetto terapeutico della lattoferrina contro il COVID-19.

Si inizierà con una breve introduzione sul SARS-CoV-2 e il COVID-19 approfondendo successivamente l'utilizzo degli integratori per contrastare il virus. Dopo la trattazione generale sul panorama delle sostanze nutraceutiche che potrebbero fornire il loro contributo nella prevenzione e il trattamento della malattia, verrà analizzata più nel dettaglio la lattoferrina, con le sue caratteristiche strutturali e proprietà terapeutiche. Ci si concentrerà in particolar modo sugli studi che hanno considerato le azioni antivirali, immunomodulatorie e antinfiammatorie della proteina.

Nel capitolo conclusivo della tesi verranno analizzati diversi studi svolti in questi due anni di pandemia il cui tema centrale è l'utilizzo della lattoferrina nella prevenzione e nel trattamento del COVID-19. I risultati di questa indagine suggeriscono come la lattoferrina potrebbe rappresentare un valido aiuto nella terapia per il COVID-19.

CAPITOLO 1

Nel seguente capitolo verrà descritto il virus SARS-CoV-2 e la malattia da coronavirus denominata COVID-19. Verranno inoltre analizzati i meccanismi che stanno alla base dell'infezione e la progressione della stessa, descrivendone i sintomi e le complicazioni.

1. IL COVID-19

Il COVID-19, acronimo di “*coronavirus disease 2019*” è la sindrome virale causata dal SARS-CoV-2. Alla fine di dicembre 2019, diverse strutture sanitarie a Wuhan, nella provincia cinese di Hubei, hanno segnalato gruppi di pazienti con polmonite di causa sconosciuta. Analogamente ai soggetti affetti da SARS e MERS, questi hanno mostrato sintomi di polmonite virale, tra cui febbre, tosse e fastidio al torace e, nei casi gravi, dispnea e infiltrazione polmonare bilaterale. Mediante il sequenziamento dell'RNA e l'isolamento del virus da campioni di liquido di lavaggio bronco alveolare dei pazienti, un team indipendente di scienziati cinesi ha identificato che l'agente eziologico di questa malattia emergente fosse un beta-coronavirus che non era mai stato visto prima, denominato successivamente SARS-CoV-2 (Zhu *et al.*, 2020). L'11 marzo 2020 l'Organizzazione Mondiale della Sanità dichiara ufficialmente lo stato di pandemia.

La rapida diffusione, specie nelle categorie più deboli, principalmente ultrasessantenni e persone affette da altre malattie (diabete, malattie cardiovascolari, ecc.), hanno comportato numerosi *lockdown*, stili di vita maggiormente sedentari e una crisi economica mondiale (Halami *et al.*, 2020).

1.1. Il virus SARS-CoV-2

Il SARS-CoV-2 è un virus altamente trasmissibile e patogeno, appartenente alla grande famiglia dei *Coronaviridae* e alla sottofamiglia *Coronavirinae*, che infetta uccelli e mammiferi (Shi *et al.*, 2020). I coronavirus sono virus a RNA a singolo

filamento positivo, dotati di pericapside. La loro forma a corona deriva dalla presenza di proteine a forma di spinula (proteina *spike*) sulla superficie (Shereen *et al.*, 2020). Le proteine *spike* facilitano l'adesione del virus alla superficie delle cellule del tratto respiratorio. Il tessuto epiteliale umano del naso, bocca e polmoni, contiene il recettore dell'enzima 2 convertitore dell'angiotensina (ACE2), utilizzato dal virus come recettore per il suo ingresso. Il virus lega i recettori per l'enzima ACE2 sulla superficie delle cellule proprio grazie alla glicoproteina *spike* (Hoffmann *et al.*, 2020).

Una volta dentro la cellula, il virus rilascia il suo RNA e inizia il processo di replicazione. Esso utilizza la cellula ospite per produrre le componenti per la sua moltiplicazione, dopo la quale i nuovi virioni appena formati vengono rilasciati dalle cellule danneggiate, causandone la morte (Shereen *et al.*, 2020; Cascella *et al.*, 2020). Successivamente nuove cellule vengono invase dai nuovi virioni, come rappresentato nella Figura 1.

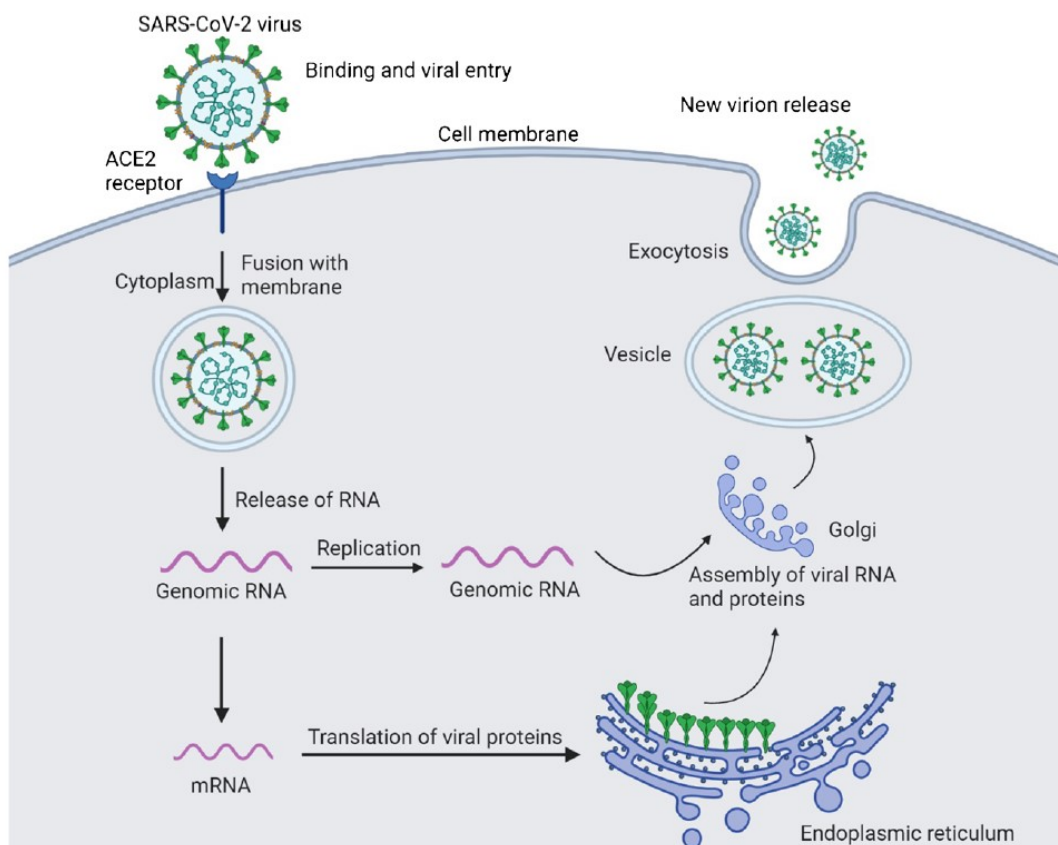


Figura 1 – Il meccanismo di infezione da SARS-CoV-2.

Fonte: Khatiwada, S., Subedi, A. (2021) "A Mechanistic Link Between Selenium and Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)", *Curr Nutr Rep* 10.

1.2. Infezione da SARS-CoV-2

La patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2 nell'uomo si manifesta con sintomi lievi fino a grave insufficienza respiratoria. Legandosi alle cellule epiteliali nel tratto respiratorio, il SARS-CoV-2 inizia a replicarsi e migrare verso le vie aeree inferiori, fino ad entrare nelle cellule epiteliali alveolari nei polmoni. Dopo il suo ingresso, il virus inibisce o ritarda la risposta immunitaria dell'interferone¹ (IFN) dell'ospite. Le prove disponibili dagli studi dei meccanismi d'azione di altri virus membri della stessa famiglia suggeriscono che il virus inibisce la produzione di IFN di tipo 1 e la segnalazione a valle del recettore dell'interferone- α/β (IFNAR) (Channappanavar *et al.*, 2017). A seguito della compromissione del sistema IFN, si verifica la replicazione del virus nelle cellule.

La replicazione virale, a sua volta, innesca l'attivazione di monociti, macrofagi e granulociti. Il risultato è la conseguente condizione iper-infiammatoria descritta come "*tempesta di citochine*" caratterizzata da una massiccia secrezione di citochine pro-infiammatorie, tra cui interleuchina IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e fattore di necrosi tumorale (TNF)- α . Ciò si traduce in una iperinfiammazione dei tessuti e conseguente fibrosi tissutale e polmonite (Shi *et al.*, 2020; Channappanavar *et al.*, 2017; Olagnier *et al.*, 2020), fino ad arrivare nei casi più gravi alla sindrome da distress respiratorio acuto e insufficienza respiratoria. Quest'ultima è considerata la principale causa di morte nei pazienti con COVID-19 (Mehta *et al.*, 2020)

Il virus viene trasmesso principalmente tramite goccioline di saliva, espulse dal paziente durante il parlato (WHO, 2020). Tuttavia, possono essere visualizzate anche particelle più piccole e molto più numerose note come particelle di aerosol, che potrebbero rimanere nell'aria per molto tempo e poi penetrare in profondità nei polmoni se inalate da qualcun altro (Meselson, M *et al.*, 2020). Inoltre, SARS-CoV-2 è estremamente resistente all'ambiente esterno e può sopravvivere per oltre 3 giorni

¹ Gli interferoni appartengono alla famiglia delle citochine. Sono rilasciati dalla cellula invasa dal virus, fornendo una resistenza aspecifica all'infezione virale interferendo transitoriamente con la replicazione dello stesso o di altri virus in altre cellule ospiti. Fonte: Lauralee Sherwood (2012), "*Fondamenti di fisiologia umana*", 4° ed., Piccin-Nuova Libreria.

sulle superfici di plastica e acciaio, aumentando la probabilità di infezione (Van Doremalen et al., 2020).

Le manifestazioni cliniche variano molto in base all'età. In generale, gli uomini più anziani (ultrasessantenni) con comorbidità hanno maggiori probabilità di sviluppare malattie respiratorie gravi che richiedono il ricovero in ospedale, e nel peggiore dei casi possono portare a morte. Tramite revisioni sistematiche e meta-analisi è stato possibile affermare che la presenza di malattie croniche, come ipertensione, diabete, malattie cardiovascolari e respiratorie, è significativamente maggiore nei pazienti critici o deceduti da COVID-19 (Zheng *et al.*, 2020). Nei giovani e i bambini, invece, i casi di polmonite grave sono molto più rari e spesso l'infezione ha un decorso asintomatico (Guan W. J. *Et al.*, 2020). Più dell'80% dei soggetti positivi al virus, infatti, presenta solo sintomi lievi, o non ne presentano affatto. Proprio questi casi costituiscono dei vettori inconsapevoli del virus (Cascella *et al.*, 2020).

L'infezione da SARS-CoV-2 è in genere caratterizzata da febbre, tosse secca e stanchezza, ma anche congestione nasale, anosmia, mal di gola e diarrea (Cascella *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2020). Nei casi più gravi di COVID-19 possono manifestarsi anche polmonite multifocale e sindrome da *distress* respiratorio (ARDS) (Cevick *et al.*, 2020).

Nonostante il COVID-19 sia una malattia dell'apparato respiratorio che colpisce in particolar modo i polmoni, recenti studi hanno dimostrato come SARS-CoV-2 sia in grado di infettare anche i tessuti e gli organi extrapolmonari (Gupta *et al.*, 2020).

Tra le manifestazioni extrapolmonari della malattia vi sono tromboembolismo, disfunzione miocardica e aritmia, sindromi coronariche acute, danni renali acuti, iperglicemia e chetosi, sintomi neurologici, sintomi oculari e complicazioni dermatologiche (Cascella *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2020). Le prove a nostra disposizione oggi suggeriscono che l'infezione da SARS-CoV-2 provoca stress ossidativo direttamente, aumentando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Delgado-Roche *et al.*, 2020), e indirettamente, sopprimendo la difesa antiossidante dell'ospite (Olagnier *et al.*, 2020).

La maggior parte delle persone mostra i primi segni della malattia dopo un periodo di incubazione da 1 a 14 giorni, più comunemente circa 5 giorni, mentre dispnea e polmonite si sviluppano solitamente entro 8 giorni dall'insorgenza della malattia (Wu *et al.*, 2020).

La patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2 può essere suddivisa in due fasi (Shi *et al.*, 2020):

- Fase 1: una fase asintomatica con o senza virus rilevabile;
- Fase 2: Fase sintomatica con elevata carica virale.

La prima fase è caratterizzata da un periodo di incubazione asintomatico, durante il quale il virus potrebbe anche non essere rilevabile. In questa fase si osserva la soppressione della risposta dell'immunità innata e un aumento dello stress ossidativo. La seconda, invece, è sintomatica, il virus è rilevabile e la carica virale è elevata, caratterizzata da danno dovuto all'infiammazione (Shi *et al.*, 2020).

Durante l'incubazione e le fasi non gravi, è necessaria una specifica risposta immunitaria adattativa per eliminare il virus e precludere la progressione della malattia alle fasi più gravi. Pertanto, le strategie da adottare per aumentare le risposte immunitarie in questa fase sono sicuramente importanti. Tuttavia, quando la risposta immunitaria protettiva è compromessa, il virus si propagherà e si verificherà una massiccia distruzione dei tessuti colpiti, specialmente negli organi che hanno un'elevata espressione di ACE2. Il virus, infatti, come detto in precedenza, entra a livello dell'epitelio delle vie aeree dopo aver legato la sua proteina Spike ai recettori ACE2.

La fase 1 è cruciale perché gli individui, in questo stadio sono portatori del virus, ovvero possono diffondere l'infezione, inconsapevolmente.

Il monitoraggio degli individui durante la fase 1, accompagnata dall'aumento della risposta immunitaria specifica adattativa e l'uso di antivirali è considerato fondamentale per prevenire l'entrata, la replicazione e la progressione della malattia

alla fase 2. Per questo motivo, la strategia da adottare dovrebbe prevedere la somministrazione di farmaci antivirali e alcuni studi suggeriscono anche l'assunzione di integratori alimentari in grado di rafforzare le difese immunitarie (Halami *et al.*, 2020). Durante la fase 2 dell'infezione, oltre a mantenere le condizioni di salute generale dei pazienti affetti, la linea di trattamento potrebbe includere l'uso di integratori alimentari in grado di sopprimere lo stress ossidativo in corso, l'infiammazione acuta e la tempesta di citochine in modo da prevenire la distruzione e il danno causato ai tessuti colpiti (Halami *et al.*, 2020).

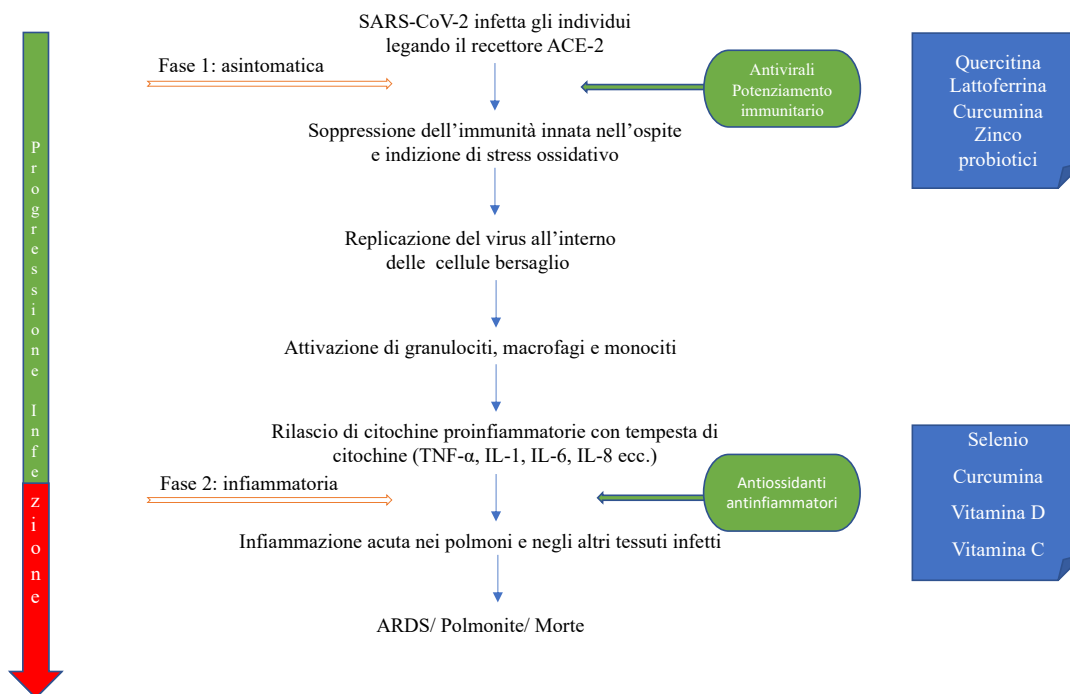


Figura 2 - Rappresentazione schematica della patogenesi di SARS-CoV-2. Adattata da Halami *et al.*, 2020.

Lo sviluppo di nuovi vaccini contro il SARS-CoV-2 è senza dubbio la chiave per controllare e prevenire l'espandersi della pandemia. Oltre ai vaccini, un'importante strategia per il controllo e il trattamento del COVID-19 consiste nel modulare il sistema immunitario utilizzando altri metodi, tra cui la plasmaterapia, la soppressione delle citochine infiammatorie, gli inibitori delle chinasi, le terapie cellulari, la terapia del complemento e la terapia con anticorpi monoclonali (Shen *et al.*, 2022).

La terapia per contrastare il COVID-19 è in continua evoluzione. Nel febbraio del 2022 c'erano 506 farmaci in fase di sviluppo di cui 419 in *trial* clinici umani². Nonostante lo sforzo comune di tutti i Paesi lo sviluppo di nuovi antivirali per il COVID-19 è una grande sfida che richiede molto tempo per la progettazione e la convalida. Numerosi frammenti di prove indicano che molti integratori alimentari possono ridurre il rischio o la gravità di un'ampia gamma di infezioni virali aumentando la risposta immunitaria. Questi nutrienti possono essere riutilizzati per mitigare gli effetti patologici indotti dall'infezione da SARS-CoV-2. Pertanto, l'uso di composti naturali, che verrà brevemente descritto nel capitolo successivo, può fornire un supporto profilattico e terapeutico alternativo insieme alla terapia per COVID-19.

² Fonte: <https://biorender.com/covid-vaccine-tracker>

CAPITOLO 2

In questo capitolo verrà discussa l'importanza dell'utilizzo degli integratori alimentari durante l'infezione da COVID-19 per il rafforzamento delle difese immunitarie.

Verranno presentate alcune tra le principali sostanze e per ciascuna verranno trattate brevemente le caratteristiche del nutriente e come quest'ultimo sia stato studiato per una potenziale utilità nell'ambito della patologia COVID-19.

2. GLI INTEGRATORI ALIMENTARI COME SUPPORTO PREVENTIVO E TERAPEUTICO CONTRO IL COVID-19

2.1. Come possono gli integratori essere utili contro il COVID-19?

Diversi integratori alimentari o nutraceutici presentano *claim* antiossidanti e per il rinforzo delle difese immunitarie. Tra questi possiamo includere lo zinco, la vitamina D, la vitamina C, la curcumina, i probiotici, il selenio e lattoferrina. L'utilizzo, anche in associazione, di questi ingredienti sotto forma di integratori alimentari potrebbe secondo alcuni autori essere di aiuto per rafforzare il sistema immunitario, prevenire la diffusione dei virus, impedire la progressione della malattia fino agli stadi più avanzati e di gravità superiore e sopprimere l'iper-infiammazione. Nel complesso, questi elementi potrebbero fornire un supporto sia dal punto di vista profilattico sia terapeutico contro il COVID-19 (Halami *et al.*, 2020).

È risaputo che la nutrizione abbia un impatto rilevante sullo stato di salute dell'uomo (Khatiwada *et al.*, 2021). Una dieta sana ed equilibrata, accompagnata da un adeguato esercizio fisico, è in grado di ridurre il rischio di gravi malattie croniche³. Si può affermare che l'adozione prolungata di una dieta non salutare, ricca di substrati energetici e povera di micronutrienti, aumenta il rischio e la gravità dell'infezione da SARS-CoV-2. Allo stesso modo, una dieta carente di substrati energetici e

³ "About Chronic Diseases 2020": <https://www.cdc.gov/chronicdisease/about/index.htm>

caratterizzata da un consumo inadeguato di micronutrienti (denutrizione) favorisce la contrazione della malattia infettiva (Bourke *et al.*, 2016).

In conclusione, una dieta ottimale è fondamentale per lo sviluppo di un sistema immunitario efficiente in grado di contrastare le malattie infettive, incluso il COVID-19 (Jayawardena *et al.*, 2020; Zabetakis *et al.*, 2020).

Secondo uno studio effettuato a Wuhan, la concentrazione di albumina plasmatica, indicatore dello stato nutrizionale, è significativamente più bassa nei pazienti deceduti rispetto a quelli sopravvissuti al COVID-19 (Zhou *et al.*, 2020). Un altro studio effettuato nella medesima città ha dimostrato come la maggior parte dei pazienti critici (61%) fosse affetta da un elevato rischio nutrizionale⁴ e come tra questi ci fosse un elevato rischio di mortalità (entro 28 giorni) nelle terapie intensive. Questi presentavano un'incidenza significativamente superiore di sindrome da distress respiratorio acuto, danni miocardici acuti, infezioni secondarie e shock (Zhang *et al.*, 2021).

Per queste ragioni, specialmente durante la fase 2 dell'infezione da SARS-CoV-2, con l'obiettivo di mantenere lo stato generale di salute del paziente infetto, il trattamento potrebbe essere migliorato mediante l'utilizzo di integratori alimentari che possano sopprimere lo stress ossidativo, l'infiammazione acuta e la tempesta di citochine in modo da prevenire il danno e la distruzione dei tessuti.

In aggiunta al trattamento sintomatico, la strategia per combattere l'infezione prevede l'aumento della risposta del sistema immunitario durante la fase 1 (Halami *et al.*, 2020).

Sono numerose le ricerche che hanno considerato ingredienti che possono essere presenti in alcuni integratori derivanti da spezie, erbe, frutta, radici e verdure, nella riduzione del rischio o della gravità di infezione da svariati virus, specie nelle persone con fonti alimentari inadeguate (Halami *et al.*, 2020).

In particolare, alcuni ricercatori hanno provato che la carenza di vitamine, nutrienti e minerali può avere un effetto negativo nel caso di soggetti sottoposti a trattamento di infezioni virali. Tra i micronutrienti più importanti vi sono gli acidi grassi omega-3

⁴ Il rischio nutrizionale è un rischio correlato all'alimentazione ed è causato da una nutrizione non adeguata, sia in termini di quantità che di qualità.

Fonte: <https://www.quotidianosanita.it/lettere-al-direttore>.

(l'acido eicosapentaenoico, EPA, e l'acido docosaesaenoico, DHA), selenio, zinco e le vitamine A, E, D, C, B6 e B12 (Khatiwada *et al.*, 2021). Tali nutrienti, infatti, inibiscono la produzione di mediatori infiammatori durante l'infezione virale e sono in grado di mitigare anche gli effetti patologici dell'infezione da SARS-CoV-2 (Di Renzo *et al.* 2020).

Nonostante le linee guida dell'ESPEN⁵ (*European Society for Clinical Nutrition and Metabolism*) evidenzino un ruolo positivo di questi nutrienti ed alcuni autori ne definiscano le proprietà immunostimolanti, è difficile definire un dosaggio consigliato per i soggetti affetti da COVID-19. Tuttavia, è evidente che l'apporto dietetico di tali sostanze nei pazienti dovrebbe essere aumentato oltre la dose giornaliera raccomandata (Hawryłkiewicz *et al.*, 2021).

Si può concludere, quindi, che l'uso di sostanze naturali, alcune discusse con maggior dettaglio in seguito, possa fornire un supporto a livello preventivo e terapeutico contro il COVID-19 soprattutto nel caso in cui vi sia una carenza evidente di tali composti nella dieta.

2.2. Sostanze presenti negli integratori che potrebbero avere una possibile utilità contro il COVID-19

2.2.1. Zinco

Lo zinco (Zn) è un metallo essenziale coinvolto in un'ampia varietà di processi biologici e avente la funzione di cofattore, mediatore chimico ed elemento strutturale. Crostacei, carne, fegato, formaggio, alcuni cereali (ad esempio il grano saraceno) e il pane integrale, sono ottime fonti di zinco (Jarosz *et al.*, 2020). Esso regola l'attività antinfiammatoria e possiede proprietà antiossidanti e antivirali (Read *et al.*, 2019). La carenza di zinco aumenta significativamente lo stress ossidativo e modifica la struttura dei tessuti polmonari, effetti parzialmente contrastati dagli integratori a base

⁵ L'ESPEN è un'organizzazione che si dedica alle questioni che riguardano la nutrizione clinica. Punta a espandere le conoscenze sulla nutrizione parenterale e più in generale della nutrizione clinica e del metabolismo.

Fonte: <https://www.espen.org/espen/aims>

di zinco (Biaggio *et al.*, 2010). La carenza di questo micronutriente causa l'alterazione della funzione di barriera cellulare nei tessuti epiteliali polmonari.

Lo zinco è anche in grado di modulare l'ingresso virale, la fusione, la replicazione, la traduzione delle proteine virali e la gemmazione dei virus respiratori (Read *et al.*, 2019; Ishida, 2019). Per queste ragioni, lo zinco è considerato un minerale che può avere una certa importanza durante l'infezione da COVID-19, grazie alla sua triplice proprietà immunomodulatoria, antiossidante e antivirale (Skalny *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Si è osservato che l'integrazione di zinco nei pazienti affetti da COVID-19 è in grado di aumentare l'efficacia del trattamento e ridurre i sintomi correlati all'infezione (Ischia, 2020).

La dose profilattica giornaliera è di 8-10 mg ma durante l'infezione del tratto respiratorio è consigliata una dose di 30-50 mg (Di Renzo *et al.*, 2020). Tali dati però necessitano di ulteriori sperimentazioni.

2.2.2. Vitamina D

La vitamina D è una vitamina liposolubile che ricopre un ruolo estremamente importante come immunomodulatore, antiossidante e antivirale (Prietl *et al.*, 2013; Wimalawansa, 2019), grazie alla presenza di recettori per la vitamina D nei monociti, macrofagi e cellule dendritiche. L'epitelio delle vie respiratorie umane esprime in maniera innata (costitutiva) i recettori per la vitamina D, grazie ai quali essa esercita il suo effetto contro le infezioni respiratorie (Chen *et al.*, 2013).

Studi epidemiologici affermano che la carenza di vitamina D aumenta la suscettibilità ad infezioni respiratorie virali acute (Monlezun *et al.*, 2015) mentre la sua integrazione incrementa la risposta immunitaria innata a tali infezioni, tra cui l'influenza A e B, la parainfluenza 1 e 2 e l'epatite C cronica (Zdreghea *et al.*, 2017; Abu-Mouch *et al.*, 2011).

Non c'è alcuna evidenza del fatto che la vitamina D sia in grado di agire sulla replicazione dei virus o sulla carica virale, ma alcuni studi affermano che potrebbe contribuire nel combattere l'infezione virale attraverso la repressione dell'infiammazione indotta dai virus (Halami *et al.*, 2020).

Inoltre, è stato dimostrato che la carenza di vitamina D aumenta l'incidenza e la gravità dell'infezione da SARS-CoV-2, infatti i soggetti infetti hanno manifestato ripetutamente di avere bassi livelli di tale vitamina (D'Avolio *et al.*, 2020).

Il Deficit di questa vitamina è associato a una elevata concentrazione plasmatica di citochine pro-infiammatorie e a disbiosi intestinale (Wang *et al.*, 2019). Tali ruoli sono oggi in fase di studio per comprenderne appieno l'impatto sulla malattia.

Per queste ragioni, l'integrazione di vitamina D è indicata per rinforzare le difese immunitarie contro il COVID-19 e ridurre il tasso di mortalità (Halami *et al.*, 2020).

La dose consigliata di vitamina D - presente nell'olio di pesce, fegato, uova e funghi selvatici è di 2.000 IU (50 µg al giorno), 20.000-50.000 IU nel caso di infezione nel tratto respiratorio (Di Renzo *et al.*, 2020; Bold *et al.*, 2020).

2.2.3. Selenio

Il selenio, presente nel mais, aglio, cipolla, cavoli e broccoli, rappresenta un micronutriente essenziale sia nei processi psicologici sia nel sistema immunitario (Halami *et al.*, 2020).

Il selenio supporta una più robusta risposta immunitaria agli agenti patogeni e riduce le infiammazioni dei tessuti, in particolare quelli intestinali e polmonari (Avery *et al.*, 2018).

Studi hanno dimostrato come la somministrazione di selenio possa modulare la risposta infiammatoria nei pazienti affetti da sindrome da distress respiratorio, ristabilendo lo stato antiossidante dei polmoni e abbassando i livelli di interleuchina 1 beta IL-1β e Interleuchina 6⁶ (Mahmoodpoor *et al.*, 2019).

È stata inoltre osservata una correlazione tra i livelli geografici di selenio e i tassi di guarigione da COVID-19 in diverse province della Cina (Zhang *et al.*, 2020).

Le proprietà antivirali del selenio sono mediate dai i suoi effetti antiossidanti.

Infatti, selenio e vitamina E costituiscono i principali componenti della difesa antiossidante umana (Shakoor *et al.*, 2020). L'integrazione di selenio può dunque

⁶ L'IL-6 è un'interleuchina che agisce come citochina multifunzionale, sia pro-infiammatoria, sia anti-infiammatoria. È secreta dai Linfociti T e dai macrofagi per stimolare la risposta immunitaria, ad esempio durante un'infezione.

Fonte: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Interleukin-6>

essere un valido aiuto nella lotta contro il COVID-19 a causa del suo ruolo sostanziale nel sopprimere l'inflammazone, nell'aumento dello stato antiossidante e della risposta immunitaria innata (Halami *et al.*, 2020). Il dosaggio di selenio va calibrato con attenzione, la dose generalmente impiegata negli integratori è di 55 microgrammi al giorno per l'adulto.

2.2.4. Vitamina E

La vitamina E è una vitamina liposolubile con spiccate proprietà antiossidanti. I tocoferoli sono abbondantemente presenti nelle noccioline e negli olii vegetali, semi e cereali.

Essa protegge le membrane cellulari dalle specie reattive dell'ossigeno, supporta l'integrità delle barriere epiteliali e stimola le cellule T (Elmadfa *et al.*, 2019).

La vitamina E è particolarmente importante per il suo ruolo nella regolazione della suscettibilità dell'organismo alle malattie infettive, incluse le infezioni del tratto respiratorio (Elmadfa *et al.*, 2019; Lewis *et al.*, 2019). In particolare, la vitamina E riduce il rischio di infezione negli adulti sani over 60.

La dose giornaliera raccomandata di α -tocoferolo equivalente ammonta a 10 mg per gli uomini e a 8-11 mg per le donne, 135 mg al giorno nel caso di infezioni al tratto respiratorio (Di Renzo *et al.*, 2020).

Sia il selenio sia la vitamina E agiscono come antiossidanti, incrementando il numero di cellule T, migliorando la risposta linfocitaria mitogena e l'attività delle cellule NK⁷, ma anche aumentando l'interleuchina 2 (IL-2)⁸ e riducendo, quindi, il rischio di infezione (Wu *et al.*, 2019; Kieliszek *et al.*, 2020).

⁷ Le cellule Natural Killer o cellule NK sono una classe di cellule citotossiche del sistema immunitario, particolarmente importanti nel riconoscimento e distruzione di cellule tumorali o infette da virus.

Fonte: <https://www.msmanuals.com/componenti-cellulari-del-sistema-immunitario>

⁸ L'interleuchina-2 è una citochina, necessaria al differenziamento e all'espansione dei linfociti T. stimola la crescita di cellule del sistema immunitario.

Fonte: <https://www.treccani.it/enciclopedia/interleuchina-2>

È opportuno notare che un mix di tocoferoli secondo alcuni autori sembra essere molto più efficace del solo α -tocoferolo, grazie alla varietà di recettori per questi nutrienti (Liu *et al.*, 2002).

Nonostante il ruolo benefico dal punto di vista immunitario, non sono molte le informazioni disponibili sugli effetti della somministrazione di vitamina E o di selenio a soggetti affetti da COVID-19. Tuttavia, spesso i pazienti sono stati consigliati di assumere adeguate quantità di questi nutrienti antiossidanti. Come sempre tali indicazioni vanno prese con prudenza e risulta utile integrare tali sostanze solo in caso di carenza evidente.

2.2.5. Vitamina C

La vitamina C, o acido ascorbico, è un nutriente idrosolubile che non è sintetizzabile dagli umani. La dose giornaliera raccomandata di vitamina C, contenuta soprattutto in alcune spezie, erbe, frutta e verdura, è di 60 mg (Vázquez-Fresno *et al.*, 2019).

Essa è in grado di proteggere l'organismo grazie alla sua capacità di agire sul sistema immunitario (Carr *et al.*, 2017). Questa vitamina, infatti, supporta numerose cellule immunitarie e migliora la loro capacità difensiva contro le infezioni.

È stato dimostrato che l'assunzione di vitamina C è in grado di ridurre la durata e la gravità delle infezioni dei tratti respiratori superiori (per la maggior parte infezioni virali), inclusa la comune influenza (van Driel *et al.*, 2019).

La vitamina C, inoltre, è un potente antiossidante: contrasta le specie reattive dell'ossigeno, previene la perossidazione lipidica, l'alchilazione proteica⁹, e quindi protegge le cellule dallo stress ossidativo (Traber *et al.*, 2011).

Uno studio ha evidenziato il calo della concentrazione plasmatica di vitamina C nei pazienti affetti da infezioni respiratorie acute, come la polmonite o la tubercolosi, e la riduzione della gravità e durata dell'infezione, specie nei pazienti più anziani, a seguito della somministrazione di vitamina C (Hunt *et al.*, 1994).

⁹ Un'alchilazione è una qualsiasi reazione che porta all'addizione di un gruppo alchilico (-CH₃, -CH₂CH₃, -R ecc.) ad una molecola. Nelle cellule degli organismi, l'alchilazione viene spesso usata per proteggere i nucleotidi del DNA. Se non viene controllata, può invece indurre mutazioni.
Fonte: <https://www.treccani.it/enciclopedia/ricerca/alchilazione/>

È proprio grazie alla sua azione protettiva contro le infezioni respiratorie che la vitamina C rappresenta un nutriente di interesse contro l'infezione da SARS-CoV-2. Alcuni studi hanno sottolineato come la somministrazione di vitamina C in combinazione con quella di quercetina abbia sinergici effetti antivirali, antiossidanti e immunomodulatori (Colunga Biancatelli *et al.*, 2020). Secondo un recente *trial* clinico, la somministrazione orale di 250-500 mg di quercetina, 500 mg di vitamina C due volte al giorno a soggetti sintomatici a medio-alto rischio per 7 giorni, fino ad un massimo di 3g di vitamina C e 500 mg di quercetina due volte al giorno per 7 giorni a pazienti con ventilazione/intubazione assistita, migliora notevolmente il processo di guarigione da COVID-19 (Colunga Biancatelli *et al.*, 2020).

In un altro studio si è dimostrato come elevate dosi di vitamina C somministrate ad una paziente affetta da sindrome da distress acuto (ARDS), accompagnate dall'assunzione di farmaci antivirali, abbiano condotto alla rimozione della ventilazione assistita dopo solo cinque giorni (Waqas *et al.*, 2020).

In conclusione, l'integrazione della dieta con fonti di vitamina C è considerata in grado di rafforzare il sistema immunitario, fornendo effetti anti-infiammatori e antiossidanti contro l'infezione da SARS-CoV-2, specie nei soggetti a rischio (Hunt *et al.*, 1994).

Di seguito, nella Tabella 1 vengono riassunti i principali studi condotti su pazienti affetti da COVID-19. A fronte di una bassissima tossicità della vitamina C tale integrazione potrebbe quindi avere un certo grado di interesse nello studio di nuovi o implementati schemi terapeutici

Tabella 1- Test clinici di somministrazione di vitamina C in pazienti affetti da COVID-19

Nr. test	Intervento	Criterio	Effetto primario	Paese
NCT04264533	24 g/giorno di vitamina C per 7 giorni	Pazienti COVID-19 in terapia intensiva di età maggiore o uguale a 18 anni	Giorni senza ventilazione	Cina
NCT04323514	10 g di vitamina C endovena, oltre alla terapia convenzionale	500 soggetti di età mista con indicazione di incubazione, positivi al COVID-19 con polmonite interstiziale	Riduzione tasso di mortalità ospedaliera	Italia
NCT03680274	200 mg/kg/giorno e 16 dosi di vitamina C endovena	800 soggetti di età maggiore o uguale a 18 anni in terapia intensiva curati con infusione endovenosa continua di vasopressori	Tasso di mortalità ridotto e calo di dipendenza da ventilazione meccanica	Canada
NCT04395768	50 g/kg vitamina C ogni 6 ore nel primo giorno e 100 mg/kg/6h per i successivi 7 giorni	200 pazienti da COVID-19	Ridotta gravità dei sintomi, durata della degenza ospedaliera e necessità di ventilazione	Australia

2.2.6. Probiotici

I probiotici utilizzati più comunemente appartengono a specie quali *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, seguiti da *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* ed *Escherichia Coli*. Sono utilizzati principalmente per supportare la salute dell'intestino, per migliorarne la regolazione e il suo funzionamento (Schreck *et al.*, 2017).

Anche se non è ancora stato chiarito come il microbioma intestinale fornisca dei benefici rispetto alle infezioni del tratto respiratorio, si è osservato che esso possa influire sulle risposte immunitarie sia a livello sistemico sia a livello locale, così come a livello delle mucose dei polmoni (Zelaya *et al.*, 2016).

In uno studio del 2020 “*Using probiotics to flatten the curve of coronavirus disease COVID-2019 pandemic*” si è visto come il consumo di *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* aiuti ad eliminare il virus dell'influenza nel tratto respiratorio (Baud *et al.*, 2020).

Considerando il ruolo dei probiotici nel migliorare la risposta immunitaria innata dell'organismo, i loro effetti antinfiammatori e il fatto che gli enterociti possono essere serbatoi di infezione da SARS-CoV-2 (Lin *et al.*, 2020), essi potrebbero essere utilizzati nella profilassi e come coadiuvanti per combattere la patogenesi del COVID-19 (Halami *et al.*, 2020).

Dai dati presentati emerge come alcuni degli ingredienti presenti negli integratori possano rappresentare un supporto nel decorso dell'infezione da SARS-CoV-2, agendo su vari aspetti fondamentali per mantenere un adeguato stato di salute.

Tra i nutrienti più utilizzati e di rilievo per l'aumento delle difese immunitarie negli integratori alimentari vi è la lattoferrina, che verrà discussa in maniera approfondita nel capitolo successivo. Sono note da tempo le sue proprietà battericide e antivirali, che la rendono una possibile candidata nel combattere l'infezione da SARS-CoV-2.

CAPITOLO 3

Nel seguente capitolo si andranno ad approfondire le caratteristiche chimiche e funzionali della lattoferrina. Dopo una breve introduzione, sulla struttura chimica e sulla localizzazione a livello corporeo, ne verranno analizzate le attività principali. Saranno poi approfondite più nel dettaglio le proprietà legate alla difesa dell'organismo e ne verranno elencati e discussi i principali meccanismi d'azione che ne stanno alla base.

3. LA LATTOFERRINA: PROPRIETA' TERAPEUTICHE E MECCANISMI ALLA BASE DELLE SUE MOLTEPLICI ATTIVITA'

3.1. La lattoferrina: caratteristiche strutturali

La lattoferrina, conosciuta anche come lattotransferrina, è una glicoproteina legante il ferro appartenente alla famiglia delle transferrine. Essa svolge un ruolo di rilievo nella regolazione immunitaria e di difesa contro batteri, virus e funghi. Rappresenta una componente centrale della risposta immunitaria innata nel neonato, avendo proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie (Berlutti *et al.*, 2011). È stata identificata per la prima volta nel 1939 nel latte bovino (Sorensen *et al.*, 1939) e nel 1960 è stata isolata sia dal latte umano sia da quello vaccino, rivelandosi essere la principale proteina legante il ferro nel latte umano (Groves, 1960).

A seconda della specie da cui proviene, il peso molecolare della lattoferrina varia tra i 78 e gli 80 kDa. Le lattoferrine prodotte da specie diverse mostrano una notevole similarità nella struttura e nelle funzioni svolte. Tra tutte, quella bovina e quella umana possiedono il grado di somiglianza più elevato avendo infatti il 78% della sequenza in comune (García-Montoya *et al.*, 2012).

Nel 1987, grazie al lavoro di Andersen *et al.*, viene ottenuta la prima struttura cristallografica della lattoferrina (Anderson *et al.*, 1987). Oggi la struttura

tridimensionale e la sequenza amminoacidica della glicoproteina è nota e ben consolidata.

Come rappresentato nella figura 3, essa è costituita da due lobi omologhi di forma globulare, il lobo-N e il lobo-C, che sono ulteriormente suddivisi in due domini (N1, N2 e C1, C2). Ogni lobo possiede un sito di legame per il ferro, situato all'interfaccia tra i lobi. Tali siti consentono di legare uno ione Fe^{3+} per ciascun lobo (M. Du *et al.*, 2017).



Figura 3 - Rappresentazione della struttura tridimensionale della lattoferrina bovina. Il lobo N è indicato in blu (N1 blu pallido e N2 blu scuro) e il lobo C in verde (C1 verde scuro e C2 verde chiaro). Le sfere rosse, invece, rappresentano gli ioni ferro (Superti, 2020).

Una delle caratteristiche più importanti della lattoferrina è quella di presentare una carica superficiale positiva. Questo facilita il legame con composti anionici. La zona che circonda la regione N-terminale è responsabile del legame con il DNA, l'eparina e i lipopolisaccaridi (He & Furmanski, 1995; Van Berkel *et al.* 1997).

3.2. Produzione e localizzazione della lattoferrina

La lattoferrina è prodotta e rilasciata dalle cellule epiteliali della mucosa e dai neutrofili in varie specie di mammiferi, inclusi gli esseri umani, i bovini, le capre, i cani e numerosi roditori, nonché nei pesci (González-Chávez *et al.*, 2009). Inoltre, le lattoferrine sono prodotte anche dal tessuto ematopoietico del midollo osseo (Masson *et al.*, 1971).

Nei mammiferi la concentrazione più elevata di lattoferrina si trova nel latte, mentre nelle altre secrezioni è nettamente più bassa. Il latte è un alimento che fornisce tutti i nutrienti necessari ai mammiferi, incluso l'uomo, dall'età neonatale fino all'età adulta, grazie ai suoi elementi nutrizionali: carboidrati, proteine, grassi, vitamine, peptidi, fattori di crescita, ecc. (Jadhav, 2015).

Oltre a questi elementi nutrizionali nel latte sono presenti, ma in quantità minore, composti bioattivi. È stato evidenziato da studi recenti che proprio questi composti bioattivi, presenti nel colostro come nel latte, giocano un ruolo fondamentale nella protezione del neonato da varie infezioni microbiche.

Questi componenti bioattivi possiedono numerose attività come quella antimicrobica, antinfiammatoria, antiossidante, immunomodulatoria e di trasporto dei minerali (Gobbetti *et al.*, 2002). Tra questi composti si ritrova la lattoferrina.

Rachman *et al.* (2015) evidenziarono che la concentrazione della lattoferrina varia durante tutto il periodo di allattamento: per esempio, si è osservato che nel primo giorno la sua concentrazione era maggiore rispetto ai successivi giorni di allattamento. Anche l'età e la razza influenzano la concentrazione di lattoferrina.

La Tabella 2, adattata da Levay *et al.* (1995), riporta i livelli di lattoferrina nelle varie forme del latte umano.

Tabella 2: concentrazione della lattoferrina nei diversi stadi del latte materno. Fonte: Levay *et al.*, 1995

Nr.	Tipo di latte	Concentrazione (mg/mL)
1.	Colostro	5-7
2.	Colostro pretermine	6.76 ± 1.50
3.	Colostro maturo	6.7 ± 0.7
4.	Latte di transizione	3.7 ± 0.1
5.	Latte Maturo	1.97-3.20

I livelli più elevati di questa glicoproteina si trovano nel colostro umano (~7 g/L) (Masson, 1992). Durante le altre fasi del latte materno le concentrazioni si abbassano. Nonostante la sua presenza marcata nel latte, la lattoferrina si può trovare anche in altre secrezioni corporee, come nelle lacrime, nella saliva, nei fluidi vaginali, nello

sperma, nelle secrezioni nasali e bronchiali, nella bile, nei fluidi gastrointestinali e nelle urine (Levay, 1994).

Come evidenziato nella Tabella 3, nel plasma la sua concentrazione è abbastanza bassa e deriva principalmente dai neutrofili (Iyer, 1993).

Tabella 3: concentrazione della lattoferrina in differenti fluidi e secrezioni corporee. Fonte: Iyer, 1993

Fluidi Biologici	Concentrazione (mg/mL)
Colostro	8
Latte	1.5-4
Lacrime	2
Saliva	0.008
Secrezioni vaginali	0.008
Fluido seminale	0.112
Fluido cerebrospinale	Non rilevabile
Plasma	0.0004
Liquido sinoviale	0.001

Durante le infezioni e/o i processi infiammatori, la concentrazione della glicoproteina aumenta attraverso il reclutamento di neutrofili, i quali contengono lattoferrina (Latorre *et al.*, 2009). I granulociti neutrofili costituiscono il 60%-70% dei leucociti totali. Il loro plasma contiene numerosi granuli delimitati da membrana. È proprio nei granuli secondari di queste cellule che viene contenuta la lattoferrina (Sanchez *et al.*, 1992). In condizioni normali, la concentrazione nel plasma è compresa tra 0.4 e 2.0 µg/mL e può aumentare fino a 200 µg/mL durante le infezioni e disordini immunologici (Latorre *et al.*, 2010).

Nei fluidi biologici la lattoferrina si trova sia nella sua conformazione aperta, senza ferro legato (apo-lattoferrina) sia nella sua conformazione chiusa, che lega il ferro (olo-lattoferrina). Entrambe le forme svolgono le loro funzioni per quanto riguarda la difesa dell'ospite (Telang *et al.*, 2018).

3.3. Legame tra struttura e attività

La lattoferrina per esercitare le sue attività biologiche deve prima interagire con specifici recettori. Questi sono stati identificati in diversi tessuti e in diversi tipi di cellule, tra cui quelle epatiche, intestinali, placentari, mammarie, dell'epitelio respiratorio e i linfociti (Lopez *et al.*, 2012). Perché la lattoferrina possa legarsi ai suoi recettori deve mantenere la sua integrità strutturale (Kelleher *et al.*, 2011). I domini funzionali, ad esempio il sito di legame del ferro, dipendono fortemente dalla conformazione tridimensionale della proteina e un'alterazione della sua struttura ne provoca la perdita dell'attività. È dunque importante ricordare che quando la lattoferrina è assunta per via orale viene in larga parte digerita e degradata nello stomaco (Adhikari, 2019). La proteina quindi, che viene somministrata per via orale, deve essere protetta per attraversare lo stomaco e giungere nell'intestino senza essere degradata. Tra le varie strategie adottate quella della microincapsulazione sembra essere la più promettente. Oltre alla microincapsulazione con proteine e carboidrati, si è visto anche come i liposomi possano prevenire la degradazione ad opera degli enzimi digestivi (Liu *et al.*, 2013).

In uno studio si è osservato come la liposomizzazione della lattoferrina aumentava la sua attività grazie all'aumento della stabilità, prevenendone la degradazione gastrica. Il rivestimento facilita anche l'interazione con la membrana intestinale e con i recettori specifici della lattoferrina (Onischi *et al.*, 2011). Tuttavia, la degradazione della proteina ha anche aspetti positivi poiché dalla sua digestione si originano alcuni peptidi, come la lattoferricina e la lattoferrampina (Bellamy *et al.*, 1995). Questi peptidi possiedono attività antimicrobica a causa della loro idrofobicità e carica cationica, che li rendono molecole anfipatiche. La lattoferricina, che in alcuni casi mostra un'attività antibatterica e antimicotica più potente rispetto alla lattoferrina intatta, possiede proprietà antimicrobiche, antitumorali e antinfiammatorie, mentre la lattoferrampina mostra una ampia azione antimicrobica contro batteri, virus, lieviti e parassiti (Flores-Villaseñor *et al.*, 2010).

3.4. Proprietà della lattoferrina: aspetti generali

La lattoferrina bovina, la più utilizzata per la sua facile reperibilità, il costo contenuto e la sua tollerabilità nell'essere umano (Superti, 2020), è stata approvata sia dalla *Food and Drugs Administration* (FDA) negli Stati Uniti, sia dall'autorità Europea per la sicurezza alimentare (EFSA) in Europa, come sostanza per l'utilizzo negli integratori alimentari (Rulis *et al.*, 2016; EFSA, 2012). Nello specifico la lattoferrina fa parte dell'allegato del Ministero Della Salute "Altri nutrienti e altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico" e, in particolare, appartiene all'elenco "Sostanze con apporto massimo giornaliero definito", fissato a 200mg. Ad oggi l'EFSA non ha autorizzato nessun *claim* nutrizionale specifico per i prodotti a base di lattoferrina.

Una delle funzioni della lattoferrina è il suo ruolo nella difesa non immunitaria. Viene considerata come un mediatore che collega le risposte dell'immunità innata e adattiva (Superti, 2020).

La lattoferrina si è rivelata nel corso degli anni una proteina multifunzionale ed estremamente versatile. Numerosi studi hanno messo in evidenza e confermato le sue numerose proprietà terapeutiche, facendone una sostanza di ampio interesse nel campo della ricerca, dell'industria farmaceutica e alimentare. Ad essa vengono attribuite proprietà antibatteriche, antivirali, immunomodulatorie, antinfiammatorie e antifungine. Come verrà discusso nei paragrafi successivi, queste attività sono state dimostrate da numerosi studi, sia *in vitro* che *in vivo*.

Studi *in vivo* ne hanno descritto i suoi effetti benefici nel processo di rigenerazione ossea (Gao *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2015) e nella prevenzione di malattie metaboliche come l'obesità e il diabete (Sun *et al.*, 2016). La lattoferrina possiede poi il doppio dell'affinità per il ferro rispetto alla transferrina sierica. È in grado di agire sull'omeostasi del ferro modulando la sintesi delle proteine ferroportina ed epcidina, attraverso la regolazione negativa dell'interleuchina-6 (IL-6) (Fleming *et al.*, 2005).

La lattoferrina è anche una delle proteine che è stata studiate per quanto riguarda la prevenzione e il trattamento di vari tipi di cancro. Essa sarebbe in grado di prevenire i diversi stadi del cancro, inclusi l'inizio, la promozione e la progressione. I trattamenti attuali, utilizzati nella terapia contro il cancro, comportano molto spesso danni fisiologici e psicologici. I ricercatori sono quindi sempre più orientati alla

ricerca di trattamenti antitumorali che presentino un approccio meno pericoloso possibile, per diminuire i danni collaterali nei pazienti oncologici. Ad oggi sono numerosi gli studi a conferma del fatto che la somministrazione orale di lattoferrina può inibire la crescita tumorale e ridurre la suscettibilità al cancro (Hoedt *et al.*, 2010). Si è osservato che in presenza di lattoferrina le cellule tumorali subiscono danni significativi, come l'arresto del ciclo cellulare, danni al citoscheletro e ne viene indotta l'apoptosi (Zhang *et al.*, 2014). Nonostante le evidenze ottenute, sia *in vitro* che *in vivo*, il meccanismo che sta alla base di questi effetti resta ancora in gran parte da chiarire. Vari autori propongono come meccanismo alla base di queste attività antitumorali il riconoscimento e la segnalazione cellulare attraverso i glicani sulla superficie cellulare (Iglesias-Figueroa *et al.*, 2019). È risaputo, infatti, che molte cellule cancerogene presentano un alto contenuto di proteoglicano, glicosaminoglicano e acido sialico, che sono noti per interagire con la lattoferrina. Probabilmente l'interazione di queste componenti con la glicoproteina attiva vie di segnalazione per generare effetti dannosi sulle cellule (Cutone *et al.*, 2020). È da sottolineare però che nonostante gli studi effettuati in questo campo non vi sono applicazioni registrate o indicazioni terapeutiche della lattoferrina in campo oncologico e qualunque indicazione in tale senso ad oggi non ha alcun motivo di essere presentata.

La letteratura scientifica su lattoferrina è dunque ampia ma ad oggi molto ancora c'è da studiare per evidenziarne possibili utilizzi in ambito terapeutico. È da ribadire che a tutt'oggi nonostante i molti studi nessun *claim* nutrizionale è stato proposto da EFSA.

Verranno ora analizzate più nel dettaglio le proprietà della lattoferrina che assumono un ruolo rilevante nella difesa dell'organismo.

3.4.1. Attività Antibatterica

Tra le proprietà della lattoferrina quella antimicrobica è una delle più importanti e più estensivamente supportate da numerosi studi. La sua attività antibatterica è dovuta alla sua capacità di sequestrare il ferro nel sito di infezione, necessario ai batteri per la loro crescita e sopravvivenza (Valenti *et al.*, 2005). Questa azione della lattoferrina è considerata come batteriostatica, in quanto reversibile aggiungendo ione ferrico

(Weinberg, 1993). I primi studi fecero emergere che il latte umano e la lattoferrina purificata dal latte umano esercitavano un effetto batteriostatico sulla crescita di *E. Coli* (Bullen, 1972). Il suo effetto antimicrobico ferro dipendente è stato osservato successivamente anche contro altri diversi patogeni, tra i quali *S. mutans*, *V. cholerae* e *P. aeruginosa* (Acosta-Smith, 2017).

Oltre all'attività antibatterica ferro dipendente, la lattoferrina possiede anche un'attività battericida ferro-indipendente. Per svolgere questa funzione è richiesta un'interazione diretta tra le componenti della superficie del battere e la proteina stessa. Nello specifico, un legame diretto tra la lattoferrina e il lipopolisaccaride (LPS) dei batteri Gram-negativi o l'acido lipoteicoico (LTA) dei batteri Gram-positivi è richiesto per l'effetto battericida. (Ellison *et al.*, 1988).

La porzione responsabile dell'effetto battericida, sia per i gram-positivi sia per i gram-negativi, è localizzata nella regione N-terminale. Si è osservato che la Lattoferricina (Lfcin), il derivato peptidico cationico generato in seguito alla digestione a opera della pepsina, è diverse volte più attivo rispetto alla proteina intatta nell'interagire con l'LPS e uccidere i gram-negativi (Tomita *et al.*, 1991; Bellamy *et al.*, 1992).

Nell'*E. coli*, la lattoferrina inibisce l'aderenza e la formazione di biofilm legandosi alle porzioni lipidiche del LPS, con un conseguente aumento della permeabilità di membrana e distruzione delle proteine virulente ancorate alla membrana esterna (Ochoa *et al.*, 2006).

Ulteriori conferme derivano da uno studio randomizzato in doppio cieco controllato con placebo condotto nel 2005 da Okuda *et al* (Okuda *et al.*, 2005). Venne somministrata Lattoferrina a soggetti positivi all'*Helicobacter Pylor*, concludendo che la somministrazione della glicoproteina è efficace nel sopprimere la colonizzazione da parte del battere e potrebbe rappresentare una nuova possibile terapia. Questo rappresenta solo un esempio delle applicazioni della lattoferrina bovina come agente antimicrobico nell'uomo poiché molti altri studi hanno dimostrato che la somministrazione orale può ridurre le infezioni batteriche e fungine, principalmente nel tratto gastrointestinale (Giansanti *et al.*, 2016).

La lattoferrina esercita la sua azione antimicrobica anche con altri meccanismi, oltre a quelli già elencati, come la rottura della membrana cellulare dei patogeni, la

proteolisi dei fattori di virulenza microbica, l'inibizione dell'adesione microbica alle cellule ospiti mediante il legame con i glicosamminoglicani (GAG) e il miglioramento della crescita della normale microflora probiotica commensale nell'intestino (Superti *et al.*, 2008).

3.4.2. Attività Antinfiammatoria e Immunomodulatoria

La lattoferrina sembra essere in grado di regolare, sia in positivo che in negativo, la risposta infiammatoria endogena grazie alle sue proprietà pro-infiammatorie e antinfiammatorie (Embleton *et al.*, 2013). L'attività antinfiammatoria e immunomodulatoria della lattoferrina è legata alla sua capacità di interagire con recettori specifici sulla superficie delle cellule epiteliali e sulle cellule del sistema immunitario, così come la sua capacità di legare profili molecolari associati ai patogeni (PAMPs)¹⁰, come per esempio l'LPS batterico, principalmente riconosciuti dai recettori *tool-like* (TLRs)¹¹ (Drago-Serrano *et al.*, 2017).

La lattoferrina interagisce anche con le cellule del sistema immunitario, rivestendo un ruolo importante nella differenziazione, maturazione, attivazione, migrazione, proliferazione e funzionamento delle cellule presentanti l'antigene (APCs), come i linfociti-B, neutrofilo, monociti e le cellule dendritiche (Legrand *et al.*, 2017; Kruzel *et al.*, 2017). L'interazione a livello dei linfociti-B permette la loro successiva interazione con i linfociti-T, che promuovono l'elevazione della risposta anticorpale (Kawasaki *et al.*, 2000). È anche in grado di promuovere la maturazione dei precursori dei linfociti-T in cellule T-Helper competenti e la differenziazione di cellule-B immature in cellule che presentano l'antigene (Actor *et al.*, 2009).

È stato osservato come la lattoferrina interagisca anche con altre cellule del sistema immunitario. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato infatti che i macrofagi e le

¹⁰ Pathogen associated molecular patterns: sostanze di origine batterica riconosciute dai recettori PRR (Pattern Recognition Receptors).
Fonte: <https://www.treccani.it/enciclopedia/immunologia>.

¹¹ Recettori tool-like: Sottogruppo di recettori PRR. Riconoscono strutture tipiche dei patogeni. Una volta avvenuto il legame, viene attivata la risposta immunitaria delle cellule sentinella.
Fonte: <https://www.treccani.it/enciclopedia/immunologia>.

cellule dendritiche¹² sono capaci di legare la lattoferrina tramite interazione con recettori di superficie per la proteina stessa, che ne promuove la loro maturazione e attività (Hu *et al.*, 2017).

Secondo alcuni autori la molecola esercita anche un'azione antinfiammatoria. Questa attività potrebbe essere parzialmente legata alla sua carica positiva superficiale, attraverso la quale interagisce con i gruppi carichi negativamente presenti sulla superficie delle cellule immunitarie. L'interazione può attivare vie di segnalazione che inducono una reazione fisiologica antinfiammatoria (Legrand *et al.*, 2016). Oltre all'interazione con elementi della superficie cellulare, la lattoferrina è anche in grado di entrare, tramite endocitosi, all'interno della cellula. Una volta entrata avviene la traslocazione nel nucleo (Ashida *et al.*, 2004) a livello del quale regola l'espressione genica proinfiammatoria (Suzuki *et al.*, 2008). L'effetto a livello intracellulare è l'inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-1-beta (IL-1 beta), interleuchina-6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale (TNF-alpha) da parte di cellule del sistema immunitario.

3.4.3. Attività Antivirale

L'attività antivirale della lattoferrina è stata dimostrata per la prima volta in topi infettati con il ceppo che induce la policitemia del complesso virale amico negli anni Ottanta. (Lu *et al.*, 1987). Dal 1990 l'elenco dei virus patogeni umani per i quali si è osservato un effetto inibitorio da parte della lattoferrina, si è ampliato notevolmente includendo virus nudi e virus con pericapside, così come Virus a DNA e RNA, tra i quali citomegalovirus, virus dell'immunodeficienza umana (HIV), rotavirus, poliovirus, virus respiratorio sinciziale, virus dell'epatite B, virus dell'epatite C (HCV), virus parainfluenzali umani, *alphavirus*, *human papilloma virus*, *hantavirus*, *adenovirus*, *enterovirus 71*, *echovirus 6*, virus dell'influenza A e il virus dell'encefalite giapponese (Ng *et al.*, 2015; Wakabayashi *et al.*, 2014).

¹² Cellula dendritica: cellula che appartiene al sistema immunitario e ha la funzione di presentare l'antigene ai linfociti Te B.

Fonte: <https://www.treccani.it/enciclopedia/cellula-dendritica>.

I meccanismi che stanno alla base della sua attività antivirale sono molteplici.

La lattoferrina può legare direttamente le particelle virali, deviandole dal loro bersaglio cellulare. In uno studio condotto da Akito Nozaki nel 2003, si osservò come i peptidi derivati dalla lattoferrina fossero in grado di legare il virus dell'epatite c (HCV) e prevenirne l'infezione (Nozaki *et al.*, 2003).

È in grado anche di inibire l'ingresso dei virus nelle cellule ospiti. (Berlutti *et al.*, 2011). L'entrata del virus nella cellula è un processo altamente complesso che coinvolge molecole della superficie cellulare (Spear *et al.*, 2011). I glicosaminoglicani eparan solfati (HSPG) sono stati identificati come molecole di adesione iniziale per molti virus, per aumentare la loro concentrazione a livello della superficie cellulare e per migliorare la probabilità di legare un recettore di ingresso più specifico, come ACE-2. Diversi studi hanno dimostrato il ruolo della lattoferrina nel prevenire l'ingresso del virus legandosi agli HSPGs (Andersen *et al.*, 2009). Il legame con i recettori virali impedisce il primo contatto tra virus e cellula ospite, prevenendo così l'infezione.

La localizzazione nucleare della lattoferrina in diverse cellule epiteliali umane suggerisce che essa sia in grado di esercitare il suo effetto antivirale non solo nella fase iniziale, durante l'interazione tra cellula e virus, ma anche a livello intracellulare (Berlutti *et al.*, 2011). Sebbene quasi tutti i meccanismi di azione antivirali riportati e noti implicino un effetto diretto sull'ingresso e sulla replicazione del virus causato dall'interazione tra la proteina e il virus, studi recenti condotti su lattoferrina e *norovirus* hanno mostrato un possibile, ma non ancora completamente compreso, meccanismo d'azione indiretto nella riduzione dell'infezione che coinvolge un'induzione, mediata dalla lattoferrina, della risposta innata all'interferone (Oda *et al.*, 2021).

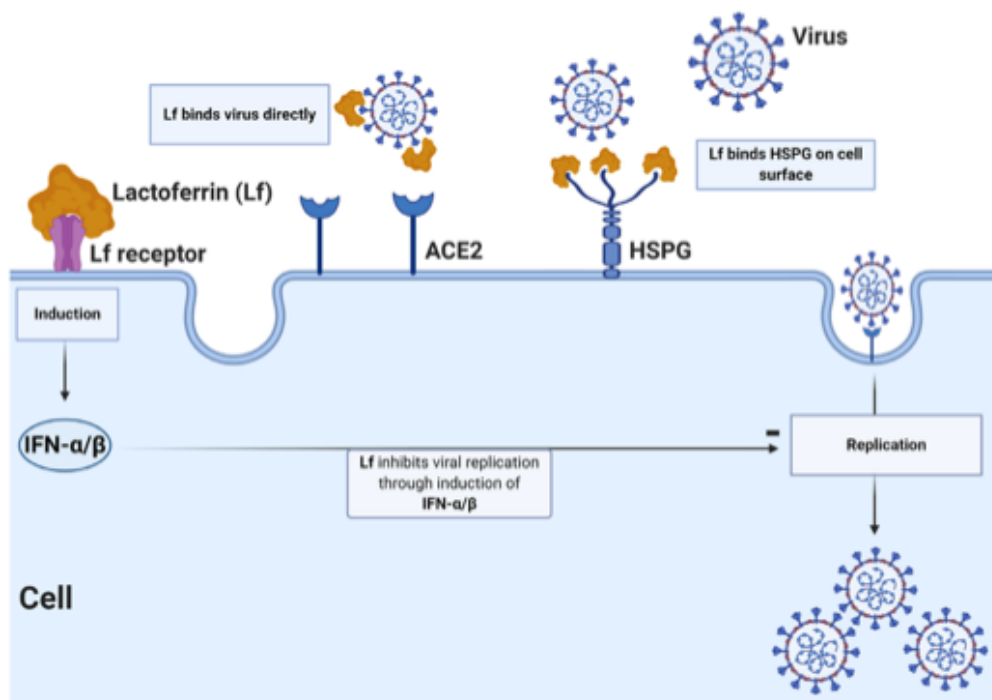


Figura 4 - Potenziali meccanismi antivirali della lattoferrina (Lf): (i) legame diretto del virus da parte di Lf; (ii) Lf che lega i proteoglicani dell'eparan solfato (HSPG) sulla superficie della cellula ospite, riducendo la navigazione virale e il successivo ingresso virale; (iii) Lf inibisce la replicazione virale attraverso l'induzione di segnali cellulari intracellulari. ACE2: enzima di conversione dell'angiotensina 2; IFN: interferone (Chang *et al.*, 2020).

3.4.4. Attività Antiossidante e di Protezione contro le disregolazioni del ferro

Nonostante il ferro sia un elemento essenziale per la vita può diventare tossico se presente in quantità eccessiva. Questa quantità eccessiva di ferro libero è dannosa perché può ricevere o donare un elettrone dalle molecole adiacenti, causando danno alle componenti cellulari o generando specie reattive dell'ossigeno (ROS). La lattoferrina riesce a controllare il bilancio fisiologico della produzione delle ROS e la loro eliminazione attraverso il sequestro del ferro (Superti, 2020). Sequestrando lo ione ferrico Fe^{3+} la lattoferrina previene così gli effetti dannosi dello stress ossidativo (Kruzel *et al.*, 2017). In uno studio pubblicato nel 2012 (Okazaki *et al.*, 2012) vennero esaminate le proprietà antiossidanti derivanti dalla somministrazione orale di lattoferrina bovina nei ratti. I risultati confermarono l'effetto antiossidante attribuito alla lattoferrina.

3.4.5. Anemia

L'anemia, definita come un numero di globuli rossi o la concentrazione di emoglobina inferiori alle soglie stabilite, è una patologia che colpisce tutte le fasce della popolazione. L'OMS ha stimato che circa il 50% di tutti i casi di anemia possono essere attribuiti alla carenza di ferro (WHO, 2007).

La lattoferrina, essendo una delle principali proteine leganti il ferro responsabili anche del suo trasporto e rilascio nelle cellule, rappresenta un elemento chiave nell'assorbimento di questo nutriente. Sono stati condotti diversi studi che supportano l'efficacia della somministrazione orale di lattoferrina per il trattamento di anemie dovute a carenze di ferro (Superti, 2020).

CAPITOLO 4

Nel capitolo precedente si sono discusse le principali proprietà e caratteristiche che rendono la lattoferrina una molecola di rilievo per quanto riguarda il suo ruolo nelle difese immunitarie. Comprese le sue funzioni come antibatterico, antivirale, immunomodulatore e il suo ruolo nell'infiammazione verrà ora analizzato il suo possibile utilizzo nella terapia contro il SARS-CoV-2.

Si andranno ad analizzare diversi studi, *in vitro* e *in vivo*, svolti in questi due anni di pandemia.

4. STUDI DEI POTENZIALI EFFETTI DELLA LATTOFERRINA NEL CONTRASTARE IL COVID-19

Un elemento importante che viene indicato come a sostegno della potenziale utilità della lattoferrina contro il COVID-19 è la sua attività antivirale ad ampio spettro, dimostrata in studi su altre infezioni respiratorie virali, tra cui SARS-CoV, virus dell'influenza A, virus della parainfluenza, adenovirus e virus respiratorio sinciziale (RSV) (Chang, *et al.*, 2020). Se si sommano a queste tutte le evidenze trattate nel capitolo precedente, appare evidente come l'interesse verso questa glicoproteina, e del suo utilizzo nel COVID-19, stia aumentando progressivamente.

Ad oggi gli studi *in vitro* e *in vivo* portati a termine sono un numero esiguo, ma i dati ottenuti risultano piuttosto promettenti. Non è quindi da escludere che, in futuro, nuovi *trial clinici* e sperimentazioni più approfondite verranno eseguite allo scopo di ottenere dati più significativi e comprendere più chiaramente come questa molecola interagisca con il virus e l'ambiente circostante.

4.1. Studi *in vitro*

In uno studio pubblicato recentemente (Yanmei *et al.*, 2021) vengono riportati i risultati sull'attività antivirale e sul meccanismo d'azione della lattoferrina contro i più comuni coronavirus umani e il SARS-CoV-2. Viene dimostrata come la lattoferrina possieda un'attività antivirale ad ampio spettro contro SARS-CoV-2, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-229E in coltura cellulare. Entrambe le lattoferrine, umana e bovina, sono state testate nello studio, ottenendo risultati paragonabili in termini di efficacia. La lattoferrina bovina risulta però avere un effetto antivirale più potente. La replicazione degli pseudovirus SARS-CoV-2 e HCoV-OC43 si è visto essere inibita dalla glicoproteina tramite il legame di quest'ultima alla cellula ospite. La lattoferrina blocca l'attacco del virus interagendo con la cellula a livello degli HSPG di membrana, non legandosi quindi direttamente al virus. Come descritto nel capitolo precedente, il legame tra lattoferrina e HSPG è uno dei meccanismi più importanti attraverso il quale la lattoferrina esercita la sua attività antivirale. Il proteoglicano eparan solfato è un polisaccaride presente abbondantemente sulla superficie di molte cellule, distribuito maggiormente nelle membrane basali delle arterie polmonari, nei granuli dei mastociti, nel fegato e nei polmoni. I risultati di vari studi piuttosto recenti suggeriscono come l'HSPG funga da fattore di attacco per il legame iniziale della proteina *spike* del SARS-CoV-2 alla cellula ospite e facilita il successivo legame con il recettore specifico ACE-2 (Zhang *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020). Yanmei Hu *et al.*, studiando il meccanismo d'azione hanno rivelato che la lattoferrina bovina lega direttamente l'eparan solfato, bloccando così il legame tra il virus e la cellula ospite come descritto nella figura 5.

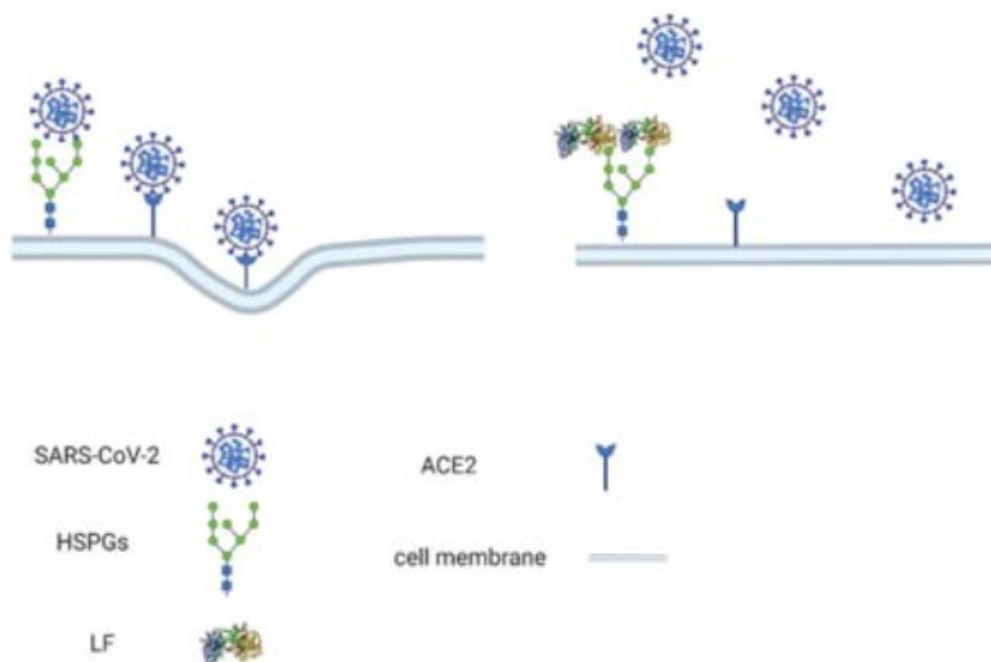


Figura 5 - le particelle virali di SARS-CoV-2 vengono reclutate sulla superficie cellulare interagendo con gli HSPG. L'interazione facilita il successivo legame al recettore specifico ACE-2 e l'internalizzazione del virione. La lattoferrina si lega agli HSPG della superficie cellulare, bloccando l'interazione tra il virus e gli HSPG, impedendo il successivo attacco virale alle cellule ospiti. Fonte: Yanmei Hu et al., 2021.

Sempre nello stesso studio sono stati effettuati anche studi di modellistica molecolare per comprendere come avvenga effettivamente il legame tra la glicoproteina e l'HSPG. Da questi emerge come la regione N-terminale carica positivamente della lattoferrina sia la porzione che lega l'HSPG, carico negativamente. Questi studi *in vitro* e *in silico* evidenziano delle potenzialità ma necessitano di ulteriori studi *in vivo* e clinici per comprenderne l'effettiva potenziale utilità.

In uno studio pubblicato sulla rivista *Nutrients* nel 2020 "*Protective effects of Lactoferrin against SARS-CoV-2 infection In Vitro*" viene valutato il ruolo della lattoferrina nella prevenzione dell'infezione da SARS-CoV-2. Gli effetti immunomodulatori e antivirali della lattoferrina sono stati testati *in vitro* utilizzando cellule epiteliali Caco-2 dell'intestino umano. I risultati ottenuti evidenziano come la

lattoferrina possa aumentare la risposta immunitaria antivirale, con un moderato effetto contro l'infezione da SARS-CoV-2 nelle cellule epiteliali intestinali.

Per valutare l'attività antivirale contro il SARS-CoV-2 è stato eseguito un test di infezione nelle cellule epiteliali umane Caco-2, che esprimono il recettore ACE-2.

Dallo studio emerge come la lattoferrina sia in grado di aumentare la trascrizione di interferoni (IFN) e indurre l'espressione di recettori *tool-like* TLR3 e TLR7, che rivestono un ruolo fondamentale nel percepire i virus a RNA e attivare la risposta immunitaria, aumentando i dati a sostegno dell'effetto immunomodulatorio, *in vitro*, della lattoferrina.

Nello stesso studio viene anche valutata la capacità antinfiammatoria della molecola. Per determinare se il trattamento con lattoferrina potrebbe attenuare la risposta infiammatoria innescata dall'infezione da SARS-CoV-2 *in vitro*, i ricercatori hanno testato il profilo di espressione delle citochine infiammatorie e antinfiammatorie nelle cellule infette, trattate con lattoferrina. I risultati mostrano come la somministrazione di lattoferrina prima dell'infezione possa modulare l'espressione di citochine innescata dal virus.

È stata evidenziata la correlazione fra la mortalità dovuta al COVID-19 e una sindrome da rilascio di citochine in un sottogruppo di pazienti associato a iperinfiammazione, che porta a *distress* respiratorio acuto e successivamente a morte (Mehta *et al.*, 2020). L'effetto immunomodulatorio della lattoferrina potrebbe quindi contrastare l'attivazione della tempesta di citochine, prevenendo così l'aggravarsi del COVID-19.

Nonostante i risultati siano piuttosto promettenti non possono essere tradotti direttamente nella pratica clinica. Futuri studi sono necessari per determinare il dosaggio e l'efficacia *in vivo*.

In uno studio pubblicato nel giugno del 2021 "*Lactoferrin Against SARS-CoV-2: In Vitro and In Silico Evidences*", Elena Campione e il suo team hanno portato a termine saggi *in vitro* per studiare l'attività antivirale contro il SARS-CoV-2 della lattoferrina. I risultati ottenuti supportano fortemente l'ipotesi iniziale, dimostrando come la lattoferrina eserciti la sua attività antivirale contro il SARS-CoV-2 attraverso il legame diretto sia del virus sia di componenti della superficie cellulare. I test *in vitro*

sono stati effettuati su cellule Vero E6 e Caco-2 utilizzando lattoferrina bovina altamente purificata. Ciò che emerge dai saggi è come oltre al legame diretto tra la lattoferrina e gli HSPG delle cellule ospiti, trattato in precedenza, sia la lattoferrina umana che quella bovina dovrebbero essere in grado di ostacolare il riconoscimento del recettore ACE-2 da parte della glicoproteina *spike*, impedendo al virus di entrare nella cellula.

Nello stesso studio sono stati effettuate anche simulazioni matematiche al computer a supporto delle evidenze ottenute in vitro. I risultati, ottenuti attraverso *docking* molecolare e dinamica molecolare, supportano l'ipotesi di un riconoscimento diretto tra la glicoproteina *spike* virale e lattoferrina, che ostacola l'ingresso virale nelle cellule. L'affinità tra le loro superfici molecolari e il grande numero di interazioni atomiche rilevate suggeriscono che è molto probabile che avvenga questo riconoscimento. La lattoferrina, legando direttamente la proteina virale può andare ad ostacolare il legame di *spike* con il recettore ACE-2, bloccando così l'ingresso del virus nelle cellule ospiti.

Nel complesso questi risultati, nonostante i meccanismi d'azione non siano ancora stati chiariti completamente e devono essere oggetto di uno studio più approfondito, soprattutto con studi *in vitro* e clinici, fanno ipotizzare un potenziale ruolo della lattoferrina nella gestione dei pazienti affetti da COVID-19.

4.2. Studi *in vivo*

Nonostante siano presenti un numero soddisfacente di studi in vitro, sono pochi gli studi in vivo che confermano i risultati ottenuti in laboratorio.

In uno studio prospettico osservazionale non randomizzato, pubblicato nel 2020, i ricercatori sono arrivati alla conclusione che la lattoferrina bovina liposomiale può potenzialmente prevenire e curare l'infezione COVID-19 (Serrano *et al.*, 2020).

È stata utilizzata una lattoferrina liposomiale denominata "*LactoferrinTM Forte drinkable*", prodotta da Sesderma Laboratories (Valencia, Spagna), registrata come integratore alimentare in unione europea. *Lactoferrin* contiene lattoferrina (32 mg/10 ml) e vitamina C (12 mg/10 ml). Grazie all'incapsulazione con nano-liposomi la lattoferrina viene protetta dalla distruzione ad opera delle secrezioni digestive.

L'incapsulazione permette alla proteina di attraversare il duodeno e raggiungere intatta la circolazione sistemica, dove la sua biodisponibilità è molto alta (Ishikado *et al.*, 2005).

Sono stati trattati 75 pazienti positivi al COVID-19 con somministrazione orale di 4 dosi al giorno, fino ad un massimo di 6 dosi al giorno. I pazienti sono stati isolati e trattati a domicilio utilizzando un sistema remoto, esaminati due volte al giorno per 10 giorni e successivamente seguiti per un mese. Sono stati trattati, con una dose dimezzata, anche tutti i conoscenti (256) che sono stati a contatto con i pazienti positivi.

Il trattamento ha permesso un recupero veloce e completo in tutti i pazienti, entro i primi 4-5 giorni. Lo stesso trattamento, a dosaggio inferiore, è stato in grado di prevenire la malattia nelle persone sane che avevano avuto contatti con i pazienti positivi. Si è dimostrata efficace anche nel trattamento dei casi più severi di COVID-19 grazie alla sua capacità di modulare la risposta immunitaria e infiammatoria all'infezione virale. In quattro dei pazienti più critici ospedalizzati, intubati e con alti livelli di ferritina e IL-2, la somministrazione di lattoferrina ha contribuito al successo del trattamento: si è osservato una riduzione significativa della reazione iperimmune in tali pazienti, normalizzando o diminuendo i parametri di IL-6, TNF-alfa, ferritina e DD2, proteggendo i polmoni contro il *distress* respiratorio acuto.

Anche la progressione dei sintomi principali della malattia è stata documentata e i risultati ottenuti sono stati i seguenti:

- Tosse secca: All'inizio dello studio il 61% dei pazienti aveva tosse secca. Dopo 5 giorni, la percentuale si è ridotta al 38.89%. Il trattamento, quindi, ha notevolmente ridotto l'incidenza della tosse secca;
- Difficoltà respiratorie: Tutti i pazienti che avevano difficoltà respiratorie all'inizio dello studio hanno mostrato alcuni miglioramenti dopo 48 ore;
- Stanchezza: All'inizio del trattamento il 94.44% dei pazienti ha riferito di sentirsi stanco. Dopo 5 giorni, la percentuale si è ridotta a 27.78%;

- Mal di testa: All'inizio dello studio il 55.56% dei pazienti presentava un intenso mal di testa. Dopo 5 giorni nessun paziente ha riferito di avere mal di testa;
- Gusto: All'inizio dello studio il 72.22% dei pazienti presentava ageusia (la totale assenza di gusto), l'11.11% non presentava alterazioni del gusto mentre il restante 16.67% dei pazienti presentava ipogeusia (riduzione parziale del senso del gusto). Dopo 5 giorni, la percentuale di pazienti con ageusia si è ridotta a 38.89%. Al decimo giorno dello studio il 100% dei pazienti aveva completamente riacquisito il senso del gusto;
- Olfatto: All'inizio dello studio il 72.22% dei pazienti presentava anosmia (la totale assenza degli odori), il 16.67% non presentava alterazioni dell'olfatto mentre il restante 16.67% dei pazienti presentava iposomia (riduzione parziale del senso dell'olfatto). Dopo 5 giorni, la percentuale dei pazienti con anosmia è scesa a 38.89%. Il 95% dei pazienti ha recuperato il senso dell'olfatto dopo 10 giorni.

L'integratore alimentare utilizzato nel presente studio è stato anche in grado di stimolare il sistema immunitario, e allo stesso tempo migliorare il metabolismo energetico.

Nel presente studio il 94,44% dei pazienti affetti da COVID-19 soffrivano di diarrea, contrastata grazie al trattamento con lattoferrina prima del quinto giorno di trattamento (Serrano *et al.*, 2020).

Dai risultati ottenuti in questo studio emerge come il trattamento con lattoferrina è semplice, sicuro e potenzialmente efficace nel prevenire e trattare l'infezione COVID-19. Può essere utile per giovani adulti, anziani, bambini e donne in gravidanza.

Nei capitoli precedenti si è discusso di come diverse sostanze presenti negli integratori alimentari potrebbero fornire il loro contributo nel combattere l'infezione da SARS-CoV-2. Nello specifico si sono discusse le varie peculiarità della vitamina

D e i suoi possibili campi di applicazione contro il COVID-19. Nel 2019 uno studio ha confermato come la lattoferrina sia in grado di aumentare l'espressione dei recettori per la vitamina D nel colon dei topi che soffrivano di una carenza di vitamina D (Wang *et al.*, 2019). Questi risultati dovrebbero rappresentare un punto di partenza per studi futuri sulla combinazione della lattoferrina con altri nutraceutici per verificarne i loro possibili effetti sinergici.

Nell'ultimo trimestre del 2021 è stato pubblicato nel "*International Journal of Environmental Research and Public Health*" uno studio preliminare in vivo (non randomizzato) condotto da Elena Campione e la sua équipe. Obiettivo di tale studio era quello di indagare l'effetto antivirale dell'assunzione orale e intra nasale di lattoferrina bovina liposomiale, in pazienti asintomatici e con COVID-19 da lieve a moderato (Campione *et al.*, 2021).

Da aprile a giugno 2020 sono stati reclutati 92 pazienti risultati positivi al COVID-19 e successivamente divisi in tre gruppi, sulla base del trattamento somministrato (Figura 7).

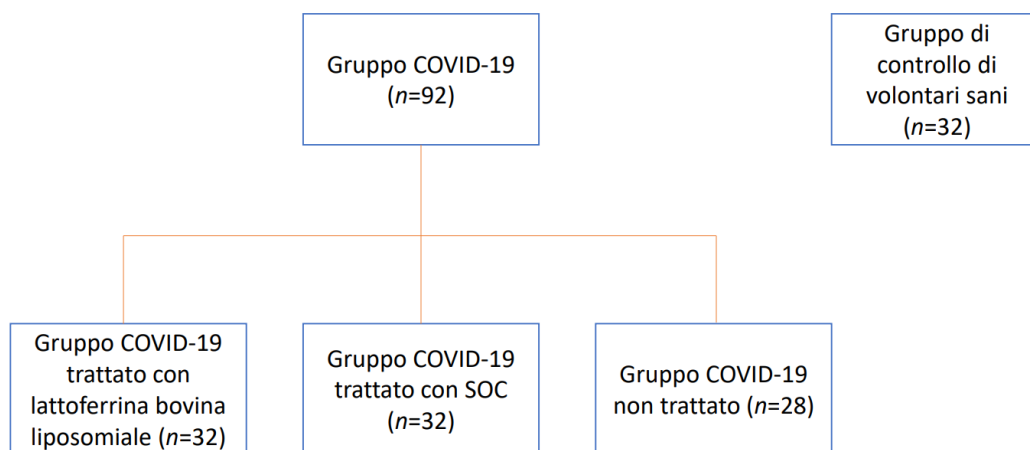


Figura 7 - Suddivisione dei pazienti sulla base del trattamento a essi fornito.
Fonte: Campione *et al.*, 2021.

Trentadue pazienti sono stati trattati con 1g/die di lattoferrina bovina liposomiale, altri 32 hanno ricevuto il regime standard di cura (SOC) mentre i rimanenti 28

pazienti non hanno ricevuto nessun tipo di cura contro il COVID-19. Per il gruppo di controllo sono stati utilizzati 32 individui negativi al COVID-19 (Campione *et al.*, 2021).

Dal test clinico emerge come, nei pazienti trattati con lattoferrina, il tempo medio per la negativizzazione del tampone naso-orofaringeo fosse di $14,25 \pm 6,0$ giorni, molto più breve di quello registrato nel trattamento con SOC e nei soggetti non trattati.

Tabella 4 - Tempo medio e deviazione standard (SD) per la conversione negativa dell'RNA della trascrittasi inversa (rRT)-PCR SARS-CoV-2 in: lattoferrina bovina liposomiale, trattamento con standard di cura (SOC) e nei pazienti COVID-19 non trattati. Fonte: Campione et al., 2021.

	Pazienti arruolati	Tempo medio per la negativizzazione del tampone naso-orofaringeo	p-Value
Pazienti COVID-19 trattati con lattoferrina bovina liposomiale	32	14.25 ± 6.0	
Pazienti COVID-19 trattati con SOC	32	27.13 ± 14.4	<0.0001
Pazienti COVID-19 non trattati	28	32.61 ± 12.2	<0.0001

Questi risultati sono in accordo con i dati ottenuti da Rosa *et al.*, in uno studio basato su *real-life clinical practice* condotto su pazienti ambulatoriali asintomatici e moderatamente sintomatici al COVID-19 trattati con la lattoferrina, da sola o in associazione come agente di supporto, registrando un tempo di negativizzazione dell'SARS-CoV-2 RNA di 15 giorni (Rosa *et al.*, 2021).

Nel capitolo precedente si è parlato di come la lattoferrina svolga anche un'azione Immunomodulatoria, inibendo la produzione delle citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-6. Nel presente studio (Campione *et al.*, 2021) sono state osservate differenze significative nei livelli ematici di IL-6, dimeri-D e ferritina. Nonostante siano richiesti studi più approfonditi, questa rappresenta la prima

evidenza documentata che dimostra la *downregulation* dell'IL-6 nei pazienti positivi al COVID-19 in seguito a trattamento con lattoferrina liposomiale. Questo potrebbe essere un dato molto importante, in quanto i livelli sierici elevati di IL-6 sono considerati associati a una maggiore gravità della malattia.

I pazienti affetti da polmonite grave da COVID-19 presentano un maggior rischio di squilibrio dei parametri della coagulazione e per questa ragione la terapia prevede il trattamento con eparina a basso peso molecolare, o non frazionata, per prevenire il tromboembolismo venoso (Marietta *et al.*, 2020). È anche su questo aspetto della malattia che il trattamento con lattoferrina potrebbe rivelarsi utile, per controllare il rischio di un'evoluzione tromboembolica dell'infezione. Uno studio recente ha evidenziato come la lattoferrina umana sia in grado di inibire l'attivazione del plasminogeno e regolare la fibrinolisi (Zwirzitz *et al.*, 2018). Questa proprietà potrebbe essere rilevante, considerando che il COVID-19 è una malattia protrombotica (Campione *et al.*, 2021).

In aggiunta, all'interno dello stesso studio si osserva poi come il trattamento con lattoferrina vada ad aumentare la conta piastrinica, inducendo la clearance virale (Campione *et al.*, 2021). È stato appurato come una delle conseguenze del COVID-19 sia la trombocitopenia. Il SARS-CoV-2 infatti sembrerebbe intrappolare i megacariociti, bloccando così il rilascio delle piastrine da quest'ultimi (Thachil *et al.*, 2020).

Per quanto riguarda i sintomi clinici della malattia, nei pazienti trattati, si è osservata una riduzione di tutti i sintomi, ad eccezione dell'affaticamento. Non sono stati rilevati particolari effetti collaterali, arrivando alla conclusione che la lattoferrina è ben tollerata e sicura. Nonostante i promettenti risultati bisogna tenere in considerazione le piccole dimensioni del campione dei pazienti affetti da COVID-19 reclutati nello studio. In futuro, effettuando studi su un campione più numeroso, sarà possibile una valutazione più approfondita del ruolo della lattoferrina nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 (Campione *et al.*, 2021).

Si è discusso nel capitolo precedente di come la lattoferrina sia in grado di chelare il ferro, e di come questa attività possa essere di fondamentale importanza nel contrastare la replicazione virale. Una delle peculiarità del SARS-CoV-2 è quella di

poter attaccare e distruggere l'emoglobina, provocando un rilascio eccessivo di ferro nel circolo ematico. L'organismo reagisce a tale insulto aumentando la produzione di ferritina. Livelli troppo elevati di tale proteina possono causare la morte degli epatociti, innescando il rilascio di ferro dalla ferritina. Questo provoca l'aumento dei livelli di ferro libero sistemico. Questa condizione può contribuire ad aumentare l'infiammazione attraverso il danno ossidativo indotto dalle ROS. Il ferro libero può anche contribuire all'ipercoagulazione riscontrata nei pazienti con COVID-19 più gravi attraverso la conversione non enzimatica del fibrinogeno in fibrina (Habib *et al.*, 2020).

Alla luce dei fatti, si possono considerare i chelanti del ferro come una terapia adiuvante nel trattamento del COVID-19 (Perricone *et al.*, 2020). Tra questi possiamo inserire anche la lattoferrina, essendo un chelante del ferro naturale.

Una delle loro proprietà fondamentali è quella di rimuovendo il ferro dalle proteine che legano il ferro, esercitando così effetti anti-ferritina e attenuando le "sindromi iperferritinemiche" associate a COVID-19 grave (Liu *et al.*, 2020).

Nello studio di Elena Campione del 2021, trattato in precedenza, viene documentata una riduzione dei livelli di ferritina durante la somministrazione di lattoferrina bovina liposomiale, dimostrando la sua attività antinfiammatoria insieme alla sua capacità di chelazione del ferro (Campione *et al.*, 2021).

CONCLUSIONI

Il COVID-19 è una malattia infettiva dai risvolti estremamente complessi per la molteplicità delle manifestazioni cliniche, per i meccanismi fisiopatogenetici connessi e per il ruolo giocato dalla risposta immunitaria dei pazienti. Secondo l'ultimo aggiornamento sul coronavirus (27 dicembre 2021) dell'Istituto Nazionale Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani attualmente non si dispone di farmaci che possano risolvere l'infezione da SARS-CoV-2. Ad oggi la malattia si cura come i casi di influenza grave, con terapie di supporto e, nei casi più gravi, supporto meccanico alla respirazione.

I consumatori richiedono alle farmacie consigli che possano riguardare azioni preventive e di salute e spesso il mercato propone in modo diretto o indiretto l'utilizzo di integratori alimentari. In tal senso il ruolo del farmacista diventa molto importante poiché deve informare correttamente sui prodotti e conoscere in modo approfondito quanto finora è stato studiato sui principali ingredienti presenti sul mercato. Va sottolineato che nessun integratore può vantare effetti terapeutici o preventivi in tali disturbi o in altri e questa informazione è una delle più importanti da sottolineare ai pazienti. Alcuni propongono l'utilizzo di lattoferrina in pazienti affetti da COVID-19 e in questa tesi si sono presi in considerazione gli studi finora condotti in merito.

In vitro si è evidenziato che la lattoferrina interferisce con il legame del virus alla cellula ospite interagendo con l'HSPG di membrana, fattore di attacco per il legame iniziale della proteina *spike* del SARS-CoV-2 alla cellula. Inoltre, legando direttamente la proteina virale può ostacolare il legame delle proteine virali *spike* con il recettore ACE-2, bloccando così l'ingresso del virus nelle cellule ospiti. Questi meccanismi forniscono dei dati preliminari che non possono supportare ad oggi alcuna azione in tale senso.

Studi su un numero di soggetti limitati hanno cercato di correlare la somministrazione di lattoferrina in una fase preventiva dell'infezione evidenziando che tale supplementazione potrebbe essere in grado di modulare l'espressione di citochine infiammatorie innescata dal virus, ma tali studi necessitano di ulteriori conferme.

In clinica sono presenti piccoli studi che sembrerebbero mostrare come i pazienti trattati con lattoferrina presentano tempi per la negativizzazione del tampone nasoro-faringeo più brevi rispetto ai soggetti non trattati, ma anche in questo caso i dati necessitano di ulteriori conferme.

Nonostante le sperimentazioni analizzate restituiscano dei risultati promettenti non esistono, ad oggi, evidenze solide e incontrovertibili, derivanti da studi clinici controllati, di efficacia del trattamento con lattoferrina, pertanto nessun utilizzo di tale sostanza per questa indicazione è quindi raccomandato o consigliabile. In un contesto più generale va ribadito in modo chiaro che ad oggi non sono presenti indicazioni nel sito AIFA sull'utilizzo di integratori alimentari durante il COVID-19.

BIBLIOGRAFIA

- Abu-Mouch, S., Fireman, Z., Jarchovsky, J., Zeina, AR., Assy, N. (2011), “Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naïve patients”, *World J Gastroenterol*.
- Acosta-Smith, E., Viveros-Jimenez, K., Canizalez-Roman, A., Reyes-Lopez, M., Bolscher, J.G.M., Nazmi, K., Flores-Villasenor, H., Alapizco-Castro, G., de la Garza, M., Martinez-Garcia, J.J. *et al.* (2017), “Bovine Lactoferrin and Lactoferrin-Derived Peptides Inhibit the Growth of *Vibrio cholerae* and Other *Vibrio* species”, *Front. Microbiol*.
- Actor, JK., Hwang, SA., Kruzel, ML. (2009), “Lactoferrin as a natural immune modulator”, *Curr Pharm Des*.
- Adhikari, B., Wang, B., Timilsena, Y.P., Blanch, E. (2019), “Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*.
- Ashida, K., Sasaki, H., Suzuki, Y.A., Lönnerdal, B. (2004), “Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells”, *BioMetals*.
- Avery, JC., Hoffmann, PR. (2018), “Selenium, selenoproteins, and immunity”, *Nutrients*.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kavase, K., Tomita, M. (1992), “Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericide peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin”, *J. Appl. Bacteriol*.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M.J. (1992), “Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin”, *Appl. Bacteriol*.

- Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., Valenti, P. (2011), “Antiviral Properties of Lactoferrin - A Natural Immunity Molecule”, *Molecules*.
- Biaggio, V.S., Pérez Chaca, M.V., Valdéz, S.R., Gómez, N.N., Gimenez, M.S. (2010), “Alteration in the expression of inflammatory parameters as a result of oxidative stress produced by moderate zinc deficiency in rat lung”, *Exp Lung Res*.
- Bold, J., Harris, M., Fellows, L., Chouchane, M. (2020), “Nutrition, the digestive system and immunity in COVID-19 infection”, *Gastroenterol Hepatol. Bed Bench*.
- Bourke, CD., Berkley, JA., Prendergast, AJ. (2016), “Immune dysfunction as a cause and consequence of malnutrition”, *Trends Immunol*.
- Bullen, J.J., Rogers, H.J., Leigh, L. (1972), “Iron-binding proteins in milk and resistance to Escherichia coli infection in infants”, *Br. Med. J*.
- Campione, E., Lanna, C., Cosio, T., Rosa, L., Conte, M. P., Iacovelli, F., Romeo, A., Falconi, M., Del Vecchio, C., Franchin, E., Lia, M. S., Minieri, M., Chiaramonte, C., Ciotti, M., Nuccetelli, M., Terrinoni, A., Iannuzzi, I., Coppeda, L., Magrini, A., Bernardini, S., Bianchi, L. (2021), “Lactoferrin Against SARS-CoV-2: In Vitro and In Silico Evidences”, *Frontiers in pharmacology*.
- Campione, E., Lanna, C., Cosio, T., Rosa, L., Conte, MP., Iacovelli, F., Romeo, A., Falconi, M., Del Vecchio, C., Franchin, E., Lia, MS., Minieri, M., Chiaramonte, C., Ciotti, M., Nuccetelli, M., Terrinoni, A., Iannuzzi, I., Coppeta, L., Magrini, A., Bernardini, S., Sabatini, S., Rosapepe, F., Bartoletti, PL., Moricca, N., Di Lorenzo, A., Andreoni, M., Sarmati, L., Miani, A., Piscitelli, P., Squillaci, E., Valenti, P., Bianchi, L. (2021), “Lactoferrin as

Antiviral Treatment in COVID-19 Management: Preliminary Evidence”, *Int J Environ Res Public Health*.

Carr, AC., Maggini, S., (2017), “Vitamin C and immune function”, *Nutrients*.

Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, SC., Di Napoli, R. (2020), “Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19)”, *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*.

Cevik, M., Bamford, CGG., Ho, A. (2020), “COVID-19 pandemic-a focused review for clinicians”, *Clin Microbiol Infect*.

Chang, R., Ng, TB., Sun, WZ. (2020), “Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19”, *Int J Antimicrob Agents*.

Channappanavar, R., Perlman, S. (2017), “Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology”, *Semin Immunopathol*.

Chen, Y., Zhang, J., Ge, X., Du, J., Deb, DK., Li, YC. (2013), “Vitamin D receptor inhibits nuclear factor kB activation by interacting with Ikb kinase Beta protein”, *J Biol Chem*.

Colunga Biancatelli, RML., Berrill, M., Catravas, JD., Marik, PE. (2020), “Quercetin and vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARSCoV-2 related disease (COVID-19)”, *Front Immunol*.

Cutone, A., Rosa, L., Ianiro, G., Lepanto, M.S., Di Patti, M.C.B., Valenti, P., Musci, G. (2010), “Lactoferrin’s Anti-Cancer Properties: Safety, Selectivity, and Wide Range of Action”, *Biomolecules*.

- D'Avolio, A., Avataneo, V., Manca, A., Cusato, J., De Nicolò, A., Lucchini, R., Keller, F., Cantù, M. (2020), "25-hydroxyvitamin d concentrations are lower in patients with positive PCR for SARS-CoV-2", *Nutrients*.
- Delgado-Roche L, Mesta F. (2020), "Oxidative stress as key player in severe acute respiratory Syndrome Coronavirus (SARSCoV) infection", *Arch Med Res*.
- Di Renzo, L., Gualtieri, P., Pivari, F., Soldati, L., Attinà, A., Cinelli, G., Leggeri, C., Caparello, G., Barrea, L., Scerbo, F. (2020), "Eating Habits and Lifestyle Changes during COVID-19 Lockdown: An Italian Survey", *J. Transl. Med*.
- Di Renzo, L., Gualtieri, P., Pivari, F., Soldati, L., Attinà, A., Leggeri, C., Cinelli, G., Tarsitano, M.G., Caparello, G., Carrano, E. *et al.* (2020), "COVID-19: Is there a role for Immunonutrition in obese patient?", *J. Transl. Med*.
- Drago-Serrano, M.E., Campos-Rodriguez, R., Carrero, J.C., De La Garza, M. (2017), "Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections", *Int. J. Mol. Sci*.
- Du M., Liu M., Fan F., Shi P., Tu M. (2017), "Structure, Function, and Nutrition of Lactoferrin", *Zhao G. (eds) Mineral Containing Proteins. Springer*.
- EFSA. (2012) "Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on bovine lactoferrin", *EFSA J*.
- Ellison, R.T., Giehl, T.J., La Force, F.M. (1988), "Damage of the outer membrane of enteric gram negative bacteria by lactoferrin and transferrin", *Infect. Immun*.
- Elmadfa, I., Meyer, A.L. (2019), "The Role of the Status of Selected Micronutrients in Shaping the Immune Function", *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*.

- Embleton, N.D., Berrington, J.E., McGuire, W., Stewart, C.J., Cummings, S.P. (2013), "Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential", *Semin. Fetal Neonat. Med.*
- Fleming, R.E., Bacon, B.R. (2005), "Orchestration of Iron Homeostasis", *N. Engl. J. Med.*
- Flores-Villaseñor, H., Canizalez-Román, A., Reyes-Lopez, M., Nazmi, K., de la Garza, M., Zazueta-Beltrán, J., León-Sicairos, N., Bolscher, J.G. (2010), "Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFc_{in}, LFc_{ampin} and LFc_{chimera} on antibiotic-resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli", *Biometals.*
- Gao, R., Watson, M., Callon, K.E., Tuari, D., Dray, M.S., Naot, D., Amirapu, S., Munro, J.T., Cornish, J., Musson, D.S. (2017), "Local application of lactoferrin promotes bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model as demonstrated by micro-CT and histological analysis", *J. Tissue Eng. Regen. Med.*
- García-Montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. (2012), "Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview", *Biochim Biophys.*
- Giansanti, F., Panella, G., Leboffe, L., Antonini, G. (2016), "Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties", *Pharmaceuticals (Basel).*
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G. (2002), "Bioactive peptides in dairy products, *Handbook of Food Products Manufacturing*", Y.H. Hui (ed.), John Wiley and Sons, Inc, Hoboken.
- González-Chávez, S.A., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. (2009), "Lactoferrin: Structure, function and applications", *Int. J. Antimicrob. Agents.*
- Groves, M.L. (1960), "The isolation of a red protein from milk", *J. Am. Chem. Soc.*

- Guan, W-j., Ni, Z-y., Hu, Y., Liang, W-h., Ou, C-q., He, J-x. *et al.* (2020), “Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China”, *N Engl J Med*.
- Guan, W. J. *et al.* (2020), “Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China”, *N. Engl. J. Med*.
- Gupta, A., Madhavan, MV., Sehgal, K., Nair, N., Mahajan, S., Sehrawat, TS., *et al.* (2020), “Extrapulmonary manifestations of COVID-19”, *Nat Med*.
- Habib, HM., Ibrahim, S., Zaim, A., Ibrahim, WH. (2021), “The role of iron in the pathogenesis of COVID-19 and possible treatment with lactoferrin and other iron chelators”, *Biomed Pharmacother*.
- Halami, P.M., Janhavi, P., Mrityunjaya, M., Neelam, R., Pavithra, V., Ravindra, P.V. (2020), “Immune-Boosting, Antioxidant and Anti-inflammatory Food Supplements Targeting Pathogenesis of COVID-19”, *Frontiers in Immunology*.
- Hawryłkiewicz, V., Lietz-Kijak, D., Kaźmierczak-Siedlecka, K., Sołek-Pastuszka, J., Stachowska, L., Folwarski, M., Parczewski, M., Stachowska, E. (2021), “Patient Nutrition and Probiotic Therapy in COVID-19: What Do We Know in 2021?”, *Nutrients*.
- He, J., & Furmanski, P. (1995), “Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA”, *Nature*.
- Hoedt, E., Hardivillé, S., Mariller, C., Ellass, E., Perraudin, J.P., Pierce, A. (2010), “Discrimination and evaluation of lactoferrin and delta-lactoferrin gene expression levels in cancer cells and under inflammatory stimuli using TaqMan real-time PCR”, *Biometals*.

- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S. *et al.* (2020), “SARSCoV-2 cell entry depends on ace2 and tmprss2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor”, *Cell*.
- Hu, L., Hu, X., Long, K., Gao, C., Dong, H.-L., Zhong, Q., Gao, X.-M., Gong, F.Y. (2017), “Extraordinarily potent proinflammatory properties of lactoferrin-containing immunocomplexes against human monocytes and macrophages”, *Sci*.
- Hunt, C., Chakravorty, N., Annan, G., Habibzadeh, N., Schorah, C. (1994), “The clinical effects of vitamin C supplementation in elderly hospitalised patients with acute respiratory infections”, *Int. J. Vitam. Nutr.*
- Hunt, C., Chakravorty, N.K., Annan, G., Habibzadeh, N., Schorah, C.J. (1994), “The clinical effects of vitamin C supplementation in elderly hospitalised patients with acute respiratory infections”, *Int J Vitam Nutr Res*.
- Iglesias-Figueroa, B., Siqueiros-Cendón, T.S., Gutierrez, D.A., Aguilera, R.J., Espinoza-Sánchez, E.A., Arévalo-Gallegos, S., Varela-Ramirez, A., Rascón-Cruz, Q. (2019), “Recombinant human lactoferrin induces apoptosis, disruption of F-actin structure and cell cycle arrest with selective cytotoxicity on human triple negative breast cancer cells”, *Apoptosis*.
- Ischia, J. (2020), “High-dose Intravenous Zinc (HDIVZn) As Adjunctive Therapy in COVID-19 Positive Critically Ill Patients: a Pilot Randomized Controlled Trial”, <https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?id=379579&isReview=true>.
- Ishida, T. (2019), “Review on the role of Zn²⁺ ions in viral pathogenesis and the effect of Zn²⁺ ions for host cell-virus growth inhibition”, *Am J Biomed Sci Res*.

- Ishikado, A., Imanaka, H., Takeuchi, T. (2005), "Liposomalization of lactoferrin enhanced it's anti-inflammatory effects via oral administration", *Biol Pharm Bull.*
- Iyer, S., Lönnerdal, B. (1993), "Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism", *Eur. J. Clin. Nutr.*
- Jadhav, R.N., Parkar, D.R., Pimpliskar Mukesh, R. (2015), "Antibacterial Activity of Lactoferrin: A Review", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research.*
- Jarosz, M., Rychlik, E., Stos', K., Charzewska, J. (2020), "Normy Z' ywienia dla Populacji Polski i ich Zastosowanie", *Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Pa 'nstwowy Zakład Higieny.*
- Jayawardena, R., Sooriyaarachchi, P., Chourdakis, M., Jeewandara, C., Ranasinghe, P. (2020), "Enhancing immunity in viral infections, with special emphasis on COVID-19: A review", *Diabetes Metab Syndr.*
- Kawasaki, Y., Sato, K., Shinmoto, H., Dosako, S. (2000), "Role of basic residues of human lactoferrin in the interaction with B lymphocytes", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*
- Kelleher, S.L., Jiang, R., Lopez, V., Lönnerdal, B. (2011), "Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells", *J. Cell Physiol.*
- Khawiwada, S., Subedi, A. A. (2021), "Mechanistic Link Between Selenium and Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)", *Curr. Nutr. Rep.*
- Kieliszek, M., Lipinski, B. (2020), "Selenium supplementation in the prevention of coronavirus infections (COVID-19)", *Med. Hypotheses.*

- Kruzel, M.L., Zimecki, M., Actor, J.K. (2017), “Lactoferrin in a Context of Inflammation-Induced Pathology”, *Front. Immunol.*
- Latorre, D., Puddu, P., Valenti, P., Gessani, S. (2010), “Reciprocal Interactions between Lactoferrin and Bacterial Endotoxins and Their Role in the Regulation of the Immune Response”, *Toxins.*
- Lauralee Sherwood (2012), “*Fondamenti di fisiologia umana*”, 4° ed., Piccin-Nuova Libreria.
- Legrand, D. (2016), “Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator”, *J. Pediatr.*
- Levay, P.F., Viljoen, M. (1995), “Lactoferrin: A general review”, *Haematologica*
- Lewis, E.D., Meydani, S.N., Wu, D. (2019), “Regulatory Role of Vitamin E in the Immune System and Inflammation”, *IUBMB Life.*
- Li, W., Zhu, S., Hu, J. (2015), “Bone Regeneration Is Promoted by Orally Administered Bovine Lactoferrin in a Rabbit Tibial Distraction Osteogenesis Model”, *Clin. Orthop.*
- Lin, L., Jiang, X., Zhang, Z., Huang, S., Zhang, Z., Fang, Z. *et al.* (2020), “Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARSCoV-2 infection”, *Gut.*
- Liu, M., Wallin, R., Wallmon, A., Saldeen, T. (2002), “Mixed tocopherols have a stronger inhibitory effect on lipid peroxidation than alpha-tocopherol alone”, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*
- Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Singh, H. (2013), “Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared from milk fat globule membrane-derived phospholipids”, *J. Dairy Sci.*

- Liu, W., Zhang, S., Nekhai, S., Liu, S. (2020), “Depriving Iron Supply to the Virus Represents a Promising Adjuvant Therapeutic Against Viral Survival”, *Curr Clin Microbiol.*
- Lopez, S.A., Nonnecke, E.B., Lönnerdal, B.L. (2012), “The Lactoferrin Receptor Is Differentially Expressed across Several Human Epithelial Cell Types”, *FASEB J.*
- Lu, L., Hangoc, G., Oliff, A., Chen, L.T., Shen, R.N., Broxmeyer, H.E. (1987), “Protective influence of lactoferrin on mice infected with the polycythemia inducing strain of Friend virus complex”, *Cancer Res.*
- Mahmoodpoor, A., Hamishehkar, H., Shadvar, K., Ostadi, Z., Sanaie, S., Saghaleini, S.H., *et al.* (2019), “The effect of intravenous selenium on oxidative stress in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome”, *Immunol Invest.*
- Marietta, M., Coluccio, V., Luppi, M. (2020), “COVID-19, coagulopathy and venous thromboembolism: More questions than answers”, *Intern. Emerg. Med.*
- Masson, P.L., Heremans, J.F. (1971), “Lactoferrin in milk from different species”, *Comp. Biochem. Physiol.*
- Mehta, P., McAuley, D.F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R.S., Manson, J.J. (2020), “HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: Consider Cytokine Storm Syndromes and Immunosuppression”, *Lancet.*
- Meselson, M. (2020), “Droplets and aerosols in the transmission of SARS-CoV-2”, *N. Engl. J. Med.*
- Monlezun, DJ., Bittner, EA., Christopher, KB., Camargo, CA., Quraishi, SA. (2015), “Vitamin D status and acute respiratory infection: cross sectional results from

the United States National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2006”, *Nutrients*.

Ng, TB., Cheung, RCF., Wong, JH., Wang, Y., Ip, DTM., Wan, DCC. *et al.* (2015), “Antiviral activities of whey proteins”, *Appl Microbiol Biotechnol*.

Nozaki, A., Ikeda, M., Naganuma, A., Nakamura, T., Inudoh, M., Tanaka, K. *et al.* (2003), “Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein”, *J Biol Chem*.

Ochoa, T.J., Brown, E.L., Guion, C.E., Chen, J.Z., McMahon, R.J., Cleary, T.G. (2006), “Effect of lactoferrin on enteroaggregative *E. coli* (EAEC)”, *Biochem. Cell Biol*.

Oda, H., Kolawole, A. O., Mirabelli, C., Wakabayashi, H., Tanaka, M., Yamauchi, K., & Wobus, C. E. (2021) “Antiviral effects of bovine lactoferrin on human norovirus”, *Biochemistry and Cell Biology*.

Olagnier, D., Farahani, E., Thyrted, J., Cadanet, JB., Herengt, A., Idorn, M. *et al.* (2020), “Identification of SARSCoV2-mediated suppression of NRF2 signaling reveals a potent antiviral and anti-inflammatory activity of 4-octyl-itaconate and dimethyl fumarate”, *bioRxiv*.

Onishi, H. (2011), “Lactoferrin delivery systems: Approaches for its more effective use”, *Expert. Opin. Drug Deliv*.

Perricone, C., Bartoloni, E., Bursi, R., Cafaro, G., Guidelli, GM., Shoenfeld, Y., Gerli, R. (2020) “COVID-19 as part of the hyperferritinemic syndromes: the role of iron depletion therapy”, *Immunol Res*.

Prietl, B., Treiber, G., Pieber, T.R., Amrein, K. (2013), “Vitamin D and immune function”, *Nutrients*.

- Rachmana, A.B., Maheswarib, R.R., Bachroemc, M.S. (2014), “Composition and Isolation of Lactoferrin from Colostrum and Milk of Various Goat Breeds”, *Procedia Food Science*.
- Read, S.A., Obeid, S., Ahlenstiel, C., Ahlenstiel, G. (2019), “The role of zinc in antiviral immunity”, *Adv Nutr*.
- Rosa, L., Tripepi, G., Naldi, E., Aimati, M., Santangeli, S., Venditto, F., Caldarelli, M., Valenti, P. (2021), “Ambulatory COVID-19 Patients Treated with Lactoferrin as a Supplementary Antiviral Agent: A Preliminary Study”, *J Clin Med*.
- Sanchez, Lourdes., Calvo, Miguel., Brock, J. (1992), “Biological role of lactoferrin”, *Archives of disease in childhood*.
- Schreck Bird, A., Gregory, PJ., Jalloh, MA., Risoldi Cochrane, Z., Hein, DJ. (2017), “Probiotics for the treatment of infantile colic: a systematic review”, *J Pharm Pract*.
- Shakoor, H., Feehan, J., Al Dhaheri, AS., Ali, HI., Platat, C., Ismail, LC., Apostolopoulos, V., Stojanovska, L. (2020), “Immune-boosting role of vitamins D, C, E, zinc, selenium and omega-3 fatty acids: Could they help against COVID-19?”, *Maturitas*.
- Shen, Q., Li, J., Zhang, Z., Guo, S., Wang, Q., An, X., Chang, H. (2022), “COVID-19: systemic pathology and its implications for therapy”, *Int J Biol Sci*.
- Shereen, MA., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., Siddique, R. (2020), “COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human Coronaviruses”, *J Adv Res*.
- Shi, Y., Wang, Y., Shao, C., Huang, J., Gan, J., Huang, X. *et al.* (2020), “COVID-19 infection: the perspectives on immune responses”, *Cell Death Differ*.

- Skalny, A.V., Rink, L., Ajsuvakova, O.P., Aschner, M., Gritsenko, V.A., Alekseenko, S.I., Svistunov, A.A., Petrakis, D., Spandidos, D.A., Aaseth, J., Tsatsakis, A., Tinkov, A.A. (2020), “Zinc and respiratory tract infections: Perspectives for COVID-19”, *Int J Mol Med*.
- Sorensen, M., Sorensen, S.P.L. (1939), “The proteins in whey”, *Comptes-rendus des Trav. du Lab. Carlsberg*
- Spear, PG. (2004), “Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry”, *Cell Microbiol*.
- Sun, J., Ren, F., Xiong, L., Zhao, L., Guo, H. (2016), “Bovine lactoferrin suppresses high-fat diet induced obesity and modulates gut microbiota in C57BL/6J mice”, *J. Funct. Foods*.
- Superti, F. (2020), “Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life”, *Nutrients*.
- Superti, F., Berlutti, F., Paesano, R., Valenti, P. (2008), “Structure and activity of lactoferrin-a multi-functional protective agent for human health”, *Iron Metabolism and Disease*.
- Suzuki, Y.A., Wong, H., Ashida, K.Y., Schryvers, A.B., Lönnerdal, B. (2008), “The N1 Domain of Human Lactoferrin Is Required for Internalization by Caco-2 Cells and Targeting to the Nucleus”, *Biochemistry*.
- Telang, S. (2018), “Lactoferrin: A Critical Player in Neonatal Host Defense”, *Nutrients*.
- Thachil, J. (2020), “What do monitoring platelet counts in COVID-19 teach us?”, *J. Thromb. Haemost.*

- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, K., Kavase, K. (1991), “Potent antibacterial peptides generated by pepsin of bovine lactoferrin”, *J. Dairy Sci.*
- Traber, MG., Stevens, JF. (2011), “Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective”, *Free Radic Biol Med.*
- Valenti, P., Antonini, G. (2005), “Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack”, *Cell Mol Life Sci.*
- Van Berkel, P. H., Geerts, E. M., van veen, A. H., Mericskay, M., de Boer, A. H., Nuijens, H. J. (1997), “N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA”, *Biochemical Journal.*
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, DH., Holbrook, MG., Gamble, A., Williamson, BN. *et al.* (2020), “Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1”, *N Engl J Med.*
- van Driel ML., Beller, EM., Thielemans, E., Deckx, L., Price-Haywood, E., Clark, J. *et al.* (2019), “Oral vitamin C supplements to prevent and treat acute upper respiratory tract infections”, *Cochrane Database Syst Rev.*
- Vázquez-Fresno, R., Rosana, ARR., Sajed, T., Onookome-Okome, T., Wishart, NA., Wishart, DS. (2019), “Herbs and spices- biomarkers of intake based on human intervention studies – a systematic review”, *Genes Nutr.*
- Wakabayashi, H., Oda, H., Yamauchi, K., Abe, F. (2014), “Lactoferrin for prevention of common viral infections”, *J Infect Chemother.*
- Wang, J., Li, Y., Zhao, L., Ren, F., Guo, H. (2019), “Lactoferrin Stimulates the Expression of Vitamin D Receptor in Vitamin D Deficient Mice”, *J. Funct. Foods.*

- Waqas Khan, HM., Parikh, N., Megala, SM., Predeteanu, GS. (2020), “Unusual early recovery of a critical COVID-19 patient after administration of intravenous vitamin C”, *Am. J. Case Rep.* 21.
- Wimalawansa, S.J. (2019), “Vitamin D deficiency: effects on oxidative stress, epigenetics, gene regulation, and aging”, *Biology*.
- World Health Organization. (2020), “Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)”.
- World Health Organization (2007), “Conclusions and recommendations of the WHO Consultation on prevention and control of iron deficiency in infants and young children in malaria-endemic areas”, *Food Nutr Bull*.
- Wu, D., Meydani, S.N. (2019), “Vitamin E, Immune Function, and Protection Against Infection, Vitamin E in Human Health”, *Springer*.
- Wu, Z., & McGoogan, J., M. (2020), “Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in china: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention”, *JAMA*.
- Yanmei, Hu., Xiangzhi, Meng., Fushun, Zhang., Yan, Xiang., Jun, Wang. (2021), “The in vitro antiviral activity of lactoferrin against common human coronaviruses and SARS-CoV-2 is mediated by targeting the heparan sulfate co-receptor”, *Emerging Microbes & Infections*.
- Yu, J., Yuan, X., Chen, H. *et al.* (2020), “Direct activation of the alternative complement pathway by SARS-CoV-2 spike proteins is blocked by factor D inhibition”, *Blood*.
- Zabetakis, I., Lordan, R., Norton, C., Tsoupras, A. (2020), “COVID-19: The inflammation link and the role of nutrition in potential mitigation”, *Nutrients*.

- Zdrenghea, MT., Makrinioti, H., Bagacean, C., Bush, A., Johnston, SL., Stanciu, LA. (2017), “Vitamin D modulation of innate immune responses to respiratory viral Infections”, *Rev Med Virol*.
- Zelaya, H., Alvarez, S., Kitazawa, H., Villena, J. (2016), “Respiratory antiviral immunity and immunobiotics: beneficial effects on inflammation-coagulation interaction during influenza virus infection”, *Front Immunol*.
- Zhang, J., Taylor, E.W., Bennett, K., Saad, R., Rayman, M.P. (2020), “Association between regional selenium status and reported outcome of COVID-19 cases in China”, *Am. J. Clin. Nutr.*
- Zhang, L., Liu, Y. (2020), “Potential interventions for novel coronavirus in China: a systematic review”, *J Med Virol*.
- Zhang, P., He, Z., Yu, G., Peng, D., Feng, Y., Ling, J., *et al.* (2021), “The modified NUTRIC score can be used for nutritional risk assessment as well as prognosis prediction in critically ill COVID-19 patients”, *Clin Nutr.*
- Zhang, Q., Chen, CZ., Swaroop, M. *et al.* (2020), “Heparan sulfate assists SARS-CoV-2 in cell entry and can be targeted by approved drugs in vitro”, *Cell Discov.*
- Zhang, Y., Lima, C.F., Rodrigues, L.R. (2014), “Anticancer effects of lactoferrin: Underlying mechanisms and future trends in cancer therapy”, *Nutr.*
- Zheng, Z., Peng, F., Xu, B., Zhao, J., Liu, H., Peng, J., *et al.* (2020), “Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: a systematic literature review and meta-analysis”, *J Infect.*
- Zhu, N. *et al.* (2020), “A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019”, *N. Engl. J. Med.*

Zwirzitz, A., Reiter, M., Skrabana, R., Ohradanova-Repic, A., Majdic, O., Gutekova, M., Cehlar, O., Petrovc̣íková, E., Kutejova, E., Stanek, G. *et al.* (2018), “Lactoferrin is a natural inhibitor of plasminogen activation”, *J. Biol. Chem.*

SITOGRAFIA

- <https://www.cdc.gov/chronicdisease/about/index.htm>
- <https://biorender.com/covid-vaccine-tracker>
- <https://www.espen.org/espen/aims>
- <https://www.news-medical.net/health/What-is-Interleukin-6>
- <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/immunologia-malattie-allergiche/biologia-del-sistema-immunitario/componenti-cellulari-del-sistema-immunitario>
- https://www.treccani.it/enciclopedia/interleuchina-2_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/
- <https://www.treccani.it/enciclopedia/ricerca/alchilazione/>
- https://www.quotidianosanita.it/lettere-al-direttore/articolo.php?articolo_id=78805
- <https://biorender.com/covid-vaccine-tracker>