"The Covid-19 virus double pathogenic mechanism. A new perspective".

Author: Carlo Brogna* M.D.

Abstract.

L'acetilcolina (ACh) è uno dei neurotrasmettitori meglio caratterizzati. I suoi ruoli centrali nelle aree colinergiche e nelle sinapsi del sistema nervoso centrale (SNC) e del periferico (PNS) sono ben noti. È stata la prima molecola identificata come neurotrasmettitore e sembra anche essere filogeneticamente una delle molecole di segnalazione più antica. L'ACh è stata rilevata in batteri, protozoi, funghi, alghe e piante primitive, indicando che il sistema colinergico era ampiamente distribuito negli organismi viventi prima della sua comparsa nel sistema nervoso. Il sistema nervoso autonomo (SNA) è parte integrante della storia del regno animale. Determina le reazioni di lotta-fuga oltre a delineare i ritmi di bioorganizzazione delle funzioni vitali e cognitive. Gli effetti estranei di un virus (Covid-19) che agiscono su di esso potrebbero aiutare a comprenderne meglio le funzioni.

I risultati Blastn mostrano alcuni fattori, delle proteine implicate, come la bungaro-tossina, la fosfolipasi A2 e la proteina simile attivante la protrombina. Si ottiene una correlazione positiva con diverse tossine e viene proposta la teoria del doppio meccanismo patogeno del Covid-19. Si ottiene una correlazione positiva con diverse tossine e si propone la teoria del doppio meccanismo patogeno del Covid.19. Il processo permette di delineare la possibilità sulla presenza di fattori tossici.

<u>Key words</u>: Covid-19; Blastn; toxins protein; ACh; aChE; BuChE; CBP; Zero Point; bungaro-toxins, phospholipase A2; similar prothrombin activator protein.

Introduzione.

I beta-coronavirus sono capsulati e hanno un singolo filamento di RNA con senso positivo, di dimensioni variabili da 26 a 32 kilobasi. Il genoma codifica per una varietà di proteine strutturali, non strutturali e accessorie. Nel 2002, in Cina è emersa una grave sindrome respiratoria acuta

coronavirus (SARS-CoV). L'epidemia di SARS-CoV è durata 8 mesi e ha portato a 8.098 casi umani confermati in tutto il mondo, di cui 774 (9,5%) fatali. Circa 10 anni dopo, un altro coronavirus umano altamente patogeno, la sindrome respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV), è apparso nel Regno dell'Arabia Saudita colpendo 2.260 casi in 27 paesi e di cui 803 sono stati fatali. Molti dei coronavirus umani e animali sembrano originare da una varietà di specie di pipistrelli. Sequenziati con tecniche di nuova generazione, si contano circa 200 nuovi coronavirus. Gli Studi sulla SARS-CoV suggerirono gli zibetti di palma dell'Himalaya e i procioni come ospiti più probabili responsabili della trasmissione umana. Il ruolo dei pipistrelli è stato ipotizzato successivamente. I cammelli dromedari sono un serbatoio ospite naturale per MERS-CoV, ma i casi primari di MERS-CoV non hanno avuto alcuna storia di contatto con cammelli o individui infetti. HCoV-NL63 è stato identificato nel 2004 per la prima volta in un paziente pediatrico con bronchiolite e da allora si è appreso che il virus provoca circa l'1-9% dei raffreddori comuni ogni anno e che circolava nell'uomo da secoli. Sebbene nei pipistrelli sono stati identificati virus simili al HCoV-NL63, essi hanno sequenze abbastanza distanti, suggerendo un possibile ospite intermedio. HCoV-229E, causa del raffreddore comune, sembra avere le sue origini anche nelle specie di pipistrelli. Sono stati trovati virus correlati all'HCoV-229E nei pipistrelli ipposideridi in Kenya e Ghana. Nel 2007, è stato identificato un alpha-coronavirus in un focolaio di malattia respiratoria negli alpaca degli Stati Uniti. Sono state identificate prove di cambiamenti genomici verificatesi nell'evoluzione di HCoV-229E, tra pipistrello e alpaca e successivamente tra evoluzione di alpaca ed umana. I pipistrelli restano i principali serbatoi evolutivi e driver ecologici della diversità del CoV(1).

Le sequenze genomiche del SARS sono in relazione con il CoVid-19 ed altre specie animali. Le fasi iniziali dell'epidemia scoppiata a Wuhan, dicembre 2019, sono probabilmente legate al mercato del pesce (2). Alcuni studi suggeriscono il *pipistrello come potenziale serbatoio* (3).

La sequenza genomica del SARS-CoV-2 è per il 96,2% identica alla sequenza CoVRaTG13, oltre ad avere un'identità genomica del 79,5% con SARS-CoV. Il pipistrello è sospettato come ospite naturale e la SARSCoV-2 potrebbe essere stata trasmessa all'uomo da un *ospite intermedio sconosciuto*. Si evidenzia che la SARS-CoV-2 usa il *recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2* così come la SARS-CoV e stabilisce *un legame recettoriale avido* con le cellule pneumocitiche (4,12). *L'ACE2*

receptor pneumocitico regola sia la trasmissione cross-specie che quella tra gli uomini (11). Il virione S-glicoproteina della superficie del coronavirus si lega al recettore ACE2 (13,14,15,16,). L'efficienza di adesione all'ACE2receptor è da 10 a 20 volte superiore a quello di SARS-CoV (14,15,16). L' allineamento delle sequenze proteiche e l'analisi filogenetiche, considerando che residui simili del recettore ACE sono stati osservati in molte specie, suggeriscono più possibilità di ospiti intermedi alternativi, come le tartarughe, il pangolino e i serpenti. La trasmissione interumana di SARS-CoV-2 avviene principalmente tra i familiari, compresi i parenti e amici (5,6). Il genoma completo del Coronavirus Wuhan-Hu-1 (WHCV), ceppo di SARSCoV-2, è di 29,9 kb (6) mentre SARS-CoV e MERS-CoV hanno rispettivamente genomi di RNA, a senso positivo, di 27,9 kb e 30,1 kb (7). Il genoma di SARSCoV-2 contiene un numero variabile (sei - undici) di frame di lettura aperta (ORF). Due terzi dell'RNA virale, nel primo ORF (ORF1a / b), traduce due poli-proteine, pp1a e pp1ab e codifica 16 proteine (NSP) non strutturali mentre i rimanenti ORF codificano proteine accessorie e strutturali. La restante parte codifica proteine strutturali essenziali (glicoproteina spike (S), piccola proteina busta (E), proteina matrix (M) e proteina nucleocapside (N)) e diverse proteine accessorie che interferiscono con la risposta immunitaria dell'ospite (8,9). Ci sono somiglianze genomiche e filogenetiche con SARS-CoV nel gene Sglicoproteina e nel dominio RBD (receptor-binding), che indica la capacità di trasmissione diretta umana. Le mutazioni in NSP2 e NSP3 giocano un ruolo nella capacità infettiva e nel meccanismo di differenziazione di SARS-CoV-2 (9). Il recettore dell'RNA virale gene inducibile acido retinoico I (RIG-I), recettore citosolico melanoma differenziato associato al gene 5 (MDA5) e il sintetizzatore nucleotidil-transferasi ciclico GMP-AMP (cGAS) sono responsabili del riconoscimento degli RNA e DNA nel portano all'attivazione del fattore di citoplasma. Questi complessi trascrizione fattore nucleare-B (NF-B) e ai regolatori di interferone fattore 3 (IRF3) e alla produzione di interferoni di tipo I (IFN-z) e una serie di citochine pro-infiammatorie tra cui IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GCSF, fattore di stimolazione delle colonia di macrofagi (MCSF), IP-10, MCP-1, MIP-1, fattore di crescita degli epatociti (HGF), IFN-z e TNF-z (17-18-19-20).

A Wuhan il 73% dei pazienti infetti (età media 49 anni) erano uomini, il 32 % presentava patologie di base tra cui diabete (20%), ipertensione (15%) e malattie cardiovascolari (15%). Sintomi più comuni all'esordio sono stati:

febbre (98%), tosse (76%) e mialgia o affaticamento (44%). Sintomi meno comuni: espettorato (28%), mal di testa (8%), emottisi (5%) e diarrea (3%). Il tempo medio dal primo sintomo alla dispnea è stato di 5 giorni, al ricovero in ospedale di 7 giorni e all'ARDS di 8 giorni. Il 63% dei pazienti aveva linfopenia. Tutti i pazienti avevano polmonite interstiziale con risultati anormali alla TC toracica. Le complicanze includevano: sindrome da distress respiratorio acuto (29%), RNAemia (15%), danno cardiaco acuto (12%) e infezione secondaria (10%). La maggior parte dei pazienti ha ricevuto terapia antivirale (oseltamivir, 89,9%) e molti hanno ricevuto (moxifloxacina, 64,4%; ceftriaxone, antibatterica azitromicina, 18,1% e terapia con glucocorticoidi, 44,9%). Tra il 26,1% e 32% dei pazienti è stata necessaria la terapia intensiva a causa di complicanze, tra cui la sindrome da distress respiratorio acuto (61,1%), l'aritmia (44,4%) e lo shock (30.6 %). Quest'ultimi presentavano livelli plasmatici più elevati di IL2, IL7, IL10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A e TNFα. I pazienti trattati in terapia intensiva, rispetto ai pazienti non trattati in terapia intensiva, erano più anziani (età mediana, 66 anni contro 51 anni), e il 72,2% avevano comorbilità sottostanti (23,24).

Le Linee guida (VI° ediz.) raccomandavano gli antivirali, tra cui IFN-z, lopinavir/ritonavir, ribavirin, fosfato clorochina (30). Come in passato anche in Wuhan è stata praticata l'infusione di prodotti ematici convalescenti (CBP). Essi possono derivare da sangue intero o dal plasma (sangue intero convalescente, plasma convalescente o siero convalescente, immunoglobulina umana in pool (Ig) di un paziente guarito e immunizzato, high-titre umano Ig, anticorpi policlonali o monoclonali), protocollo Ebola, Sars, Mers (22).

Wei Ji et al. 2020 suggeriscono che il 2019-nCoV ha una genetica molto simile per informazioni ai coronavirus di pipistrello e che è presente una sequenza più simile come pregiudizio al serpente (due tipi di serpenti, il Bungarus multicinctus (krait a più fasce) e il Naja atra (cobra cinese).

Materiali e Metodi.

Raccolti e analizzati i dati, pubblicati dal mese di gennaio 2020 al 28.03.2020, si postulano 10 Assiomi certi e sicuri (tabella 1) e si formula l'ipotesi assurda: "Il covid-19 non è solo un virus. Questa analisi è definita: "Reductio Ad Absurdum".

Gli assiomi (tabella 1):

- 1. Nessun studio ha negato un ospite intermedio.
- 2. Il virus Covid-19 è di tipo respiratorio.
- 3. Il virus Covid-19 ha una diffusione interumana.
- 4. Non è presente lo stesso out-come per i pazienti affetti da covid-19 indipendentemente dell'età.
- 5. Non è presente lo stesso out-come per i pazienti affetti da covid-19 indipendentemente dallo stato di salute pregresso.
- 6. Non è presente lo stesso out-come nei pazienti affetti da covid-19 indipendentemente dal sesso.
- 7. Esiste un gruppo di individui a maggior rischio di contrarre il Covid-19. (Operatori sanitari- pz con comorbilità e anziani e altri per motivi sconosciuti).
- 8. Si può contrarre il covid-19 anche per contatto diretto.
- 9. Nessun studio ha *verificato* altre proprietà e/o proteine misconosciute del covid-19 acquisite dall'ospite intermedio.
- 10. Nessun studio ha *negato* la possibilità di un'acquisizione di tratti e/o caratteristiche e/o proteine (o sequenze genomiche RNA, Micro Rna, enzimi o molecole) d'origine dall'ospite intermedio.

Le Domande da soddisfare.

- 1. Il virus Covid-19 potrebbe aver acquisito, nel suo corredo genomico, sequenze che trascrivono fattori (micro-Rna? Enzimi? Proteine? tossine? altro?) simili a quelle presenti nell'ospite intermedio? R: Sconosciuto? Ricombinazione genomica cross specie? (21)
- 2. Esiste un altro dato di laboratorio oltre al tampone oro-faringeo o nasale utile e in qualunque momento? R: Sconosciuto
- 3. Se l'ipotesi assurda fosse vera, sarebbero sufficienti le cure e le terapie attuate?

L'analisi.

Sono stati eseguiti *una serie dei blast-allineamenti* di sequenze genomiche per verificare la corrispondenza dei dati analizzati e la "*genesi*", *il* "*punto Zero*". Sono stati effettuati allineamenti attraverso l'algoritmo BLAST-(blastn ncbi.nlm.nih.gov) e sono stati praticati tra il Covid19 (id. NC_045512.2.) e il pangolino ("Manis pentadactyla") e i serpenti della Bungarus multicinctus, fasciatus e il Naja Atra produttori di tossine e suggeriti da *Wej Ji come ospite intermedio*. L'acido secreto dalle ghiandole anali del pangolino (KN005617.1, blast-n fig. 5) non ha avuto utilizzi in medicina mentre le tossine di serpente sono state particolarmente studiate, sequenziate, ricombinate, riprodotte e utilizzate per l'analisi dei meccanismi recettoriali colinergici, come precursori di molti farmaci tra cui il Captopril e congeneri, come anticoagulanti e antitumorali. Le tossine originate dai primi riscontri positivi per una correlazione significativa tra queste molecole e il genoma del Covid-19, è definita dal match con e-value basso e percentuale di identità alta. Le tossine con più correlazione sono:

B. multicinctus peptide 1 simile alla neurotossina (NL1) (X64593.1), Query cover 32%, e-value 0.5, percentuale identità 100% (fig. 1A);

Cardiotoxin VII Naja atra (id. U42584.1), Q.C. 26%, e-v. 0.048, per. Id. 100% (fig 1B);

Bungarotossina (V31) Bungarus multicinctus alfa- (id. Y17057.1) Q.C 31%, e-v.0,092 per. Id 89.47% (fig 1C);

Clone pGEMT-BMNTL4 Bungarus multicinctus mRNA (id.AJ007764.1) Q.C. 33%, e-v 0,092 per. Id. 100,00% (fig 2.D);

Alfa- bungarus3ftx Type II (id.CAB51841.1) Query 32%, e-v. 0.14, per.Id. 93,75% (fig. 2.E);

Beta bungaratoxin B2a chain Bungarus ca. (id.AAL30066.1) Q.C. 54%, e-v. 0.19, per.id. 93,33% (fig 3 F);

Prothrombin activator Tropidechis ca. (id.DQ533832.1) Q.C. 32%, e-v. 0.003, per.id. 100% (fig 3.G);

PLA2 gene for phosp. Laticauda la. (id.AB062441.1) Q.C. 16%, e-v. 0.2, per.id. 89,47% (fig 3.H);

Gene precursor di Ophiophagus hannah Ohanin (king naja), (DQ103590.1) Q.C. 16%, e-v.0.056, id.100% (fig 4.);

Il processo deduttivo/induttivo.

Le neurotossine si dividono in due categorie: a catena corta (60-62 amminoacidi, quattro ponti di-solfuro) e a catena lunga (66-74 amminoacidi o più e con cinque ponti disolfuro). Il peptide a catena lunga si lega con maggiore affinità al recettore alfa-7 nACh, attraverso il quinto ponte disolfuro (k-bungarotossina neuronale) (28). La famiglia delle tossine a tre dita (circa 70 3FTxs: cardiotossiche e neurotossiche) sono polipeptidi composti da 60-74 residui di amminoacidi. Mostrano funzionalità diverse pur avendo una struttura conservata. Una caratteristica strutturale distinta è la piega unica, costituita da tre anelli (-stranded), che emergono da un core globulare idrofobico. I quattro o cinque ponti disolfuri, obbligati tra determinate Cys, stabilizzando la struttura tridimensionale. Sottili variazioni nella lunghezza dei loro anelli, conformazioni e residui di amminoacidi sono responsabili delle loro distinte funzioni biologiche (77). Le Fasciculine, con i loro loop e amminoacidi chiave posti all'esterno, creano un complesso fasciculina-Ache (78). Anche le fosfolipasi A2 tossiche interagiscono con i recettori nicotinici dell'acetil-colina (27,36). Quasi tutte queste tossine si elevata affinità alla periferia dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (AChR) (28). In alcuni studi si è visto che gli amminoacidi dell'alfa carbotossina, Ala-28, Lys-35 e Cys-26-Cys-30 selettivamente all'alfa 7-AChR, mentre Lys-23 e Lys-49 si legano esclusivamente all' AChR Torpedo. Pertanto, l'alfa-Cbtx si lega a due sottotipi di AChR usando residui sia comuni che specifici. Il legame con le tossine si verifica probabilmente in regioni omologhe di AChR neuronali e muscolari (67,68). Probabilmente un piccolo anello ciclizzato da un legame disolfuro e presente in modo univoco nelle tossine a catena lunga potrebbe fungere da elemento discriminante principale e una piccola deviazione strutturale di una piega nelle tossine può generare un riconoscimento discriminatorio squisito per alcuni sottotipi di recettori (69). Le tossine a tre dita (3FTxs) bloccano la trasmissione post-sinaptica tramite recettori nicotinici (nAARTr). La notevole plasticità della piega della tossina a tre dita si è evoluta in modo ottimale per utilizzare diverse combinazioni di gruppi funzionali, per generare una panoplia di specificità target, per discernere sottili differenze tra i sottotipi nAChR. (33). L'alfabungarotossina si lega ai recettori nicotinici muscolo scheletrici, bloccano la trasmissione neuromuscolare (29). La protamina e la polilisina sono ancora più potenti della cardiotossina del B. multicinctus nell'inibire le colinesterasi (32,34). Certe tossine possiedono una unità fosfolipasica di

base e possiedono proprietà anticoagulanti; altre inducono l'aggregazione delle piastrine, altre ancora viceversa la inibiscono. Molte tossine «curarizzanti» con una struttura a tre dita riconoscono una proteina che si lega all'acetilcolina e bloccano i recettori nicotinici nei muscoli scheletrici provocando paralisi flaccida. Altre tossine riconoscono invece i recettori per l'acetilcolina situati sui neuroni. Le cardiotossine danneggiano il funzionamento cardiaco; esse depolarizzano le membrane di numerose cellule eccitabili e sono potenti citotossine. In totale, le tossine dotate di struttura a tre dita esercitano almeno sette funzioni differenti. Certe tossine dei veleni dei serpenti non appartengono ad alcuna delle due categorie strutturali citate in precedenza. Le sarafotossine sono peptidi vasocostrittori di 21 amminoacidi, con due ponti disolfuro. Infine, le disintegrine possiedono tutte la sequenza conservata arginina-glicina-acido aspartico e inibiscono l'aggregazione delle piastrine, di cui riconoscono una delle proteine di superficie, la glicoproteina IIa/IIIb. (70-75). Esse si legano selettivamente ai recettori dell'integrina presente sulla superficie delle piastrine e di altre cellule. Tirofiban ed Eptifibatide sono derivati e usati come agenti antitrombotici (77). Le tossine proteinasi attivano la protrombina tra cui il simil fattore di coagulazione Xa (FXa) (79). L' Inibitore di tipo Kunitz agisce inibendo le serine e le proteasi (ad es. plasmin, kallikrein, trypsin). Interferisce con la cascata della coagulazione e della fibrinolisi (76,77). Nella sindrome coronarica acuta c'è una l'elevata espressione della superficie piastrinica della chemochina CXCL12 e dei suoi recettori CXCR4-CXCR7 e influenza la prognosi (80).

La maggior parte delle tossine è comunque fonte di inibitori aChE (37). La bassa concentrazione di aChE è associata all'aumento di mortalità per qualunque causa nei pazienti con ridotta frazione d'eiezione ventricolare sinistra e il rischio di mortalità è aumentato per tutte le cause relazionato allo stato delle aChE (38). Mentre la percentuale delle colinesterasi potrebbe essere simile per sesso e per età, non così l'attività della colinesterasi degli eritrociti che può variare (39). La prevalenza della carenza di BuChE è più alta tra le persone di origine europea: tra il 3,4 e il 4% della popolazione ha una carenza parziale. La prevalenza di questa forma più grave è stimata in 1: 100.000. - La carenza di BuChE ha cause ereditarie e non ereditarie. Il difetto genetico, con mutazioni nel BCHE-Gen, è ereditato in modo autosomico recessivo (locus E1 nella regione cromosomica 3q26.1-q26.2). Il sito di acilazione / catalitica offre la triade di Ser, His e Glu per l'aChE e Ser, his e Glu per la BuChE, essa è adatta per

l'inibizione. I substrati ACh, nonché gli inibitori possono legarsi covalentemente al sito attivo in seguito all'attacco al gruppo carbonilico del substrato, da parte dell'anione idrossile Ser. Il sito mediano della colina / cationico-π all'interno della gola di aChE e BuChE contiene aminoacidi (Trp e Tyr in aChE, Trp e Ala in BuChE) che interagiscono con il gruppo amminico quaternario all'interno del residuo di colina di ACh per orientare in modo ottimale la molecola. Il blocco della gola e, quindi, l'approccio del substrato alla triade catalitica all'interno del sito di acilazione/catalitica ridurranno chiaramente la capacità di aChE e/o BuChE di metabolizzare prolungheranno ACh la sua azione farmacologica (55,56,57,58,59,60,61,62,63,64).

In tutti i disturbi associati a un deficit colinergico presinaptico corticale riflesso da un'estesa perdita di colina acetil-transferasi (malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson e sindrome di Down) c'è una sostanziale riduzione del legame di (3H) nicotina al recettore nicotinico. Al contrario, le riduzioni di entrambi i sottotipi di muscarinici (M1 e M2) sono di misura moderata nella malattia di Alzheimer mentre significativamente aumentati (apparentemente non in relazione al trattamento farmacologico anticolinergico) nel morbo di Parkinson e nei casi con demenza ma non in quelli senza. (81).

Una carenza non ereditaria di BuChE possono manifestarsi in gravidanza, nei neonati o anche in caso di infezioni croniche, malnutrizione, malattie del fegato e neoplasie, anemia da carenza di ferro e farmaci come cocaina, morfina, codeina, succinil-colina, avvelenamento da OP" o da eccesso di inbitori di acetil-colinesterasi (Assunzione per PD e AD). Inibire l'acetil-colinesterasi (aChE) e aumentare la disponibilità di acetilcolina nelle sinapsi colinergiche, migliora la trasmissione colinergica nel trattamento farmacologico del morbo di Alzheimer (AD). D'altro canto, l''incidenza cumulativa di polmonite è di 51,9 per 1000, ovvero 5,19%. in soggetti over 65 anni in terapia con inibitore della colinesterasi galantamina, o rivastigmina per la demenza (35).

Se le colinesterasi non aumentano entro 48 ore dall'intossicazione si associano a maggiore mortalità per eccesso di inibitori aChE (43). Si misurano con il test d'inibizione della dibucaina e del fluoruro. Il numero di dibucaina rappresenta la percentuale di inibizione dell'attività dell'enzima in presenza del farmaco o delle tossine. (41,42). I livelli di siero S100B sono più alti in pazienti ventilati meccanicamente e servono per

prevedere la necessità di una terapia più aggressiva durante l'avvelenamento acuto (42). I due enzimi strettamente omologhi, acetilcolinesterasi e butirrilcolinesterasi (aChE e BuChE, rispettivamente) sono utili come malfunzionamento nelle associate biomarcatori malattie aparasimpatico. Le misurazioni delle colinesterasi ematiche sono una lettura facilmente quantificabile per i cambiamenti nell'equilibrio simpatico / parasimpatico e le implicazioni dei cambiamenti sono intesi come lettura in salute e malattia (44). Nell'organismo coesistono due classi di enzimi colinesterasi e possiedono una serie di funzioni colinergiche e non colinergiche, a seconda del loro tempo di espressione, posizione e forma specifica del sottotipo. Sebbene l'aChE predomina anche a livello neuronale il BuChE è ampiamente localizzato e secreto dalle cellule gliali. Particolari neuroni possiedono BuChE piuttosto che aChE, e il loro ruolo nella funzione colinergica è supportato dalla loro collocazione e/o vicinanza alla colina acetil-transferasi (ChAT), l'enzima limitatore di velocità che catalizza la sintesi di ACh. Circa il 10%-15% dei neuroni colinergici all'interno dell'ippocampo umano e dell'amigdala sembrano esprimere BuChE piuttosto che aChE. Gli aChE e BuChE condividono circa il 65% dell'omologia della sequenza amminoacida sebbene codificate da diversi geni rispettivamente sui cromosomi umani 7 (7q22) e 3 (3q26). Tuttavia, entrambi legano e scindono altamente ed efficacemente l'ACh, sebbene con cinetiche leggermente diverse, rendendo identici i prodotti metabolici colina e acido acetico. L'aChE ha tre residui legati all'asparagina con carboidrati e BuChE ne ha nove, che possono influire sulla loro solubilità acquosa, stabilità, conformazione funzionale e quindi sulla loro attività biologica. Inoltre, entrambi gli enzimi possono formare ponti disolfuro con cisteine definite lungo la loro sequenza per supportare la loro dimerizzazione per generare più forme di subunità di enzimi strutturali in diversi siti del corpo all'interno del cervello, ad esempio le tre forme globulari (forme G) che comprendono una (G1), esistono principalmente due subunità catalitiche (G2) o quattro (G4). I siti associati all'idrolisi di ACh sono interiorizzati in entrambi gli enzimi. aChE e BuChE possiedono entrambi una gola stretta attiva, principalmente idrofobica, caratterizzata dalla cristallografia a raggi X nell'ordine di 20Å di profondità per AChE, in cui ACh si diffonde e poi si divide (54). L' ACh è coinvolta nella modulazione degli stati infiammatori. Dati recenti hanno dimostrato che l'ACh, derivata da innervazioni parasimpatiche inibisce il rilascio del fattore di necrosi tumorale (TNF-α) e interleuchina 1 (IL-1) dai macrofagi attraverso

l'attivazione di recettori nicotinici, e che supporta l'esistenza della via infiammatoria di un "anticolinergico" (46-47-48). Nel sistema nervoso centrale, i sottotipi di recettori nicotinici e muscarinici sono presenti sia sui neuroni che sulle cellule gliali dove mediano il controllo motorio, la regolazione della memoria, la regolazione della temperatura (ipertermia di difficile controllo), le funzioni di sinapsi e plasticità come gli autoeterorecettori. All'interno del sistema nervoso periferico, i recettori muscarinici sembrano ampiamente coinvolti in diverse funzioni, come la contrazione della muscolatura liscia, la secrezione ghiandolare e la regolazione della frequenza cardiaca (49-50). Tutti i tipi di cellule presenti all'interno del tratto respiratorio esprimono recettori muscarinici e nicotinici. Ipratropio e ossitropio (antagonisti per i recettori M1 / M3) e, più recentemente, tiotropio (non selettivo) hanno un vantaggio rispetto all'atropina o ad altri antagonisti muscarinici, derivante dalla loro farmacocinetica; la presenza di un ammonio quaternario nella loro formula chimica consente un effetto locale che ne riduce l'assorbimento da parte dei bronchi (51,52,53).

Discussione.

Le colinesterasi servono come indicatore del possibile avvelenamento mediato dall' inibizione dell'enzima dell'acetil colinesterasi. utilizzate come indice della funzionalità epatica. Si hanno livelli ematici ridotti nell'intossicazione da composti organo- fosforici, nelle disfunzioni epatiche (epatiti, ecc.), nelle cirrosi, nell'infarto miocardico, nell'infezioni acute e per fenotipi atipici dell'enzima. Le forme atipiche vengono distinte tradizionalmente in base alla resistenza all'inibizione da dibucaina, da fluoruro e quindi alla di attività della colinesterasi (Valori donna: normale: > 75% eterozigoti: 50-75% omozigoti: < 50%"; Valori uomo: normale: > 75%; eterozigoti: 50-75%; omozigoti: < 50%). Sono il bersaglio delle tossine presenti in molti veleni animali. Quelle delle tossine del serpente (Naja Atra e Bungarus m. e f.) sono le acetil colinesterasi ed in particolare le Buttiril colinesterasi (pseudo colinesterasi). Alcune tossine presentano anche proprietà simili agli agonisti del recettore nicotinico neuromuscolare. La tossicità si manifesta in parte per un aumento eccesivo dell'Ach e in parte per il blocco dei recettori nicotinici con: apnea prolungata, collasso cardiocircolatorio, aritmie cardiache, tachicardie ventricolari, alterazione della temperatura corporea, squilibrio elettrolitico (in particolare il K+), livelli plasmatici bassi della butirril colinesteasi. Gli effetti nel primo caso sono la conseguenza dell'aumento dell'azione dell'Acetilcolina (su recettori M2: effetto bradicardico con rallentamento dell'attività cardiaca e riduzione della gittata cardiaca, seguito da compenso aritmico e tachicardico) e con altri sintomi neurosensoriali aspecifici. Determinano una vasodilatazione generalizzata con conseguente rapida caduta della pressione arteriosa; sui recettori M3: aumento enorme delle secrezioni bronchiali mucose con vasocostrizione, aumento della motilità gastrointestinale. Gli effetti locali sono dovuti all'esposizione aerosol nel punto di contatto con gli occhi o con l'apparato respiratorio, oppure inseguito ad assorbimento locale di liquidi attraverso la cute o le mucose, incluse quelle del tratto gastrointestinale. La durata degli effetti è determinata in gran parte dalle caratteristiche del composto: liposolubilità, dal fatto che debba essere metabolicamente attivato o no, la stabilità del composto-aChE e "l'invecchiamento" dell'enzima fosforilato. I sintomi oculari prevedono: miosi, dolore oculare, congestione congiuntivale, riduzione della vista, spasmo ciliare e dolore alle sopracciglia. A seguito dell'assorbimento sistemico acuto, la miosi non si evidenzia in forza di una potente scarica simpatica in risposta all'ipotensione. Altri aspetti sono la rinorrea e all'iperemia si hanno: senso di costrizione al petto, dispnea, broncocostrizione e aumento delle secrezioni bronchiali. Altri sintomi saranno nausea, vomito, crampi addominali e diarrea. Fino ad arrivare agli effetti gravi da dosaggio elevato che sono: estrema salivazione, emissione involontaria di feci e urine, sudorazione, lacrimazione, bradicardia, ipotensione, aritmie e collasso cardiocircolatorio. Le azioni nicotiniche presso le giunzioni neuromuscolari sono la faticabilità del muscolo e debolezza generale, contrazioni involontarie, fascicolazioni sparse e infine aumento marcato della debolezza e paralisi dei muscoli respiratori. Gli effetti sul Snc sono lo stato confusionale, atassia, confusione verbale, perdita dei riflessi, respiro Cheyne-stokes, convulsioni, coma e paralisi respiratoria. L'effetto sui centri vasomotori e su altri centri cardiovascolari del midollo allungato porta ad ipotensione con fibrillazione e tachicardia riflessa. Gli effetti muscarinici e nicotinici a carico del SNC contribuiscono tutti alla compromissione respiratoria. Tra questi comprendono laringospasmo, bronco-costrizione, aumento delle secrezioni, compromissione dei movimenti del diaframma e dei muscoli intercostali e depressione respiratoria. La pressione arteriosa può scendere a livelli bassi da comportare irregolarità del ritmo cardiaco, effetti determinati dall'ipossiemia e antagonizzati spesso grazie alla ventilazione polmonare assistita (82). Sintomi aspecifici possono essere l'anosmia e la disgeusia. La disfunzione olfattiva è un segno 'preclinico' precoce della malattia di Parkinson, spesso precede anni e rimane l'unico sintomo prima della diagnosi della malattia che è conclamata quando ormai oltre 1'80% dei neuroni GABAergici sono persi. Il meccanismo fisiopatologico e neuronale dell'anosmia (le vie colinergiche a livelli superiori) o della disgeusia nel Parkinson ancora sono oggetto di studio. Va ricordato che queste vie neuronali non passano per i nuclei talamici ma afferiscono direttamente al complesso Ippocampo/amigdala.

Come risultati Blastn mostrano oltre le bungaro-tossine, anche la fosfolipasi A2 deve essere considerata. Le fosfolipasi A2 (PLA2) sono tra le proteine più abbondanti nel veleno di serpente. Si tratta di 16 gruppi all'interno di sei tipi principali di superfamiglie (85,86). Assomigliano l'un l'altro per strutture e proprietà catalitiche. Hanno un'attività farmacologica tossica ad ampio spettro oltre ad essere dell'idrolasi (87). John B. Harris e al. confermano che i "tipi principali PLA2" includono i PLA2s secreti (sPLA2), i PLA2 citosolici (cPLA2), i PLA2 calcio-indipendenti (iPLA2) l'asse del fattore di attivazione delle piastrine (PAF) Idrolasi/lipoproteina lipidica ossidata associata al PLA2 (LpPLA2s), la PLA2 adiposa (AdPLA2) e ai PLA2 lisosomiali (LPLA2). L'idrolisi dei glicerilfoslipidi da parte dei PLA2 si traduce nel rilascio di acidi grassi e nella relativa produzione di lipofosfolipidi (88). L'acido arachidonico (AA) è generato dai fosfolipidi della membrana attraverso la loro attivazione. Le prostaglandine sono generate nel percorso della cicloossigenasi 1 (COX1). Essi generano attraverso l'enzima trombossano sintetasi il trombossanoA2 (TXA2), un potente aggregante piastrine. L'inibizione di COX1 FANS porta ad un aumento della via delle lipossigenasi con un aumento dei prodotti finali, i leucotrieni (LB4, LC4, LD4, LE4, LF4). Il blocco del trombossano sintetasi, con il Dazoxiben e il Pirmagrel, porta ad un aumento della sintesi di prostaglandine attraverso le isomerasi (PGD2, PGF2alfa, PGE2) e la prostaciclina sintetasi (PGI2, PGF1 alfa). La PGE è un vasodilatatore potente. In tutti i distretti umani causa sia vasodilatazione e vasocostrizione ma nei polmoni solo vasocostrizione. La gittata cardiaca aumenta per via della PGE e la PGF. Il trombossano A2 è una molecola vasocostrittrice e agisce sull'aggregazione piastrinica, diminuisce il flusso sanguigno nel rene e la sua filtrazione (82). Determina un aumento degli eventi tromboembolici.

La PGF e la PGD2 inducono la contrazione dei muscoli bronchiali e tracheali, mentre la PGE il rilassamento. Gli individui asmatici e con BPCO sono molto sensibili alla PGF2. Il LTC4 e il LTD4 sono mille volte più potenti dell'istamina, agiscono sui muscoli lisci del tratto respiratorio broncocostrittori (89-92). La PLA2 sono l'infiammazione con il rilascio dei mediatori, tra cui IL-1, IL-6, IL-8, TNFz, MIP-1, NO, istamina, serotonina, PAF, bradichinina, PGE2, TXA2, LTB4, RS e anafilatossine (C3 e C5) (93). Il Desametasone inibisce la sintesi delle prostaglandine e la formazione dei leucotrieni (94), inibisce anche la cicloosigenasi/PGE (95). Agisce inibendo la PLA2, inibisce anche le citochine IL1, IL2, IL3, Il6, TNF-alfa, GM-CSF, e l'interferone gamma. Il desametasone inibisce il fattore di crescita epidermico (EGF) stimolato dalla PLA2 (cPLA2) e il rilascio di AA bloccando il reclutamento di Grb2 al recettore EGF attivato (EGF-R) attraverso un meccanismo indipendente dalla trascrizione (actinomicina-insensibile) (96).

Considerazioni.

L'allineamento Blastn suggerisce una buona correlazione tra la sequenza genetica del Covid-19 e le bungaro-tossine, fosfolipasiA2 e la proteina simile all'attivatore della protrombina di origine animale. Il serpente può essere considerato come ospite naturale intermedio (assioma 1,2,3,8,9 rispettato) e le variabili età, fenotipo, sesso, assunzioni di farmaci, patologie pregresse, esposizioni lavorative particolari (operatori sanitari, coltivatori per i pesticidi, ecc.) possono essere correlate e dipendenti dalla concentrazione della carica virale, delle tossine liberate e dalla funzionalità sia del sistema immunitario e sia delle colinesterasi (assiomi 4,5,6,7 rispettati). Non è tanto essenziale conoscere l'ospite intermedio quanto capire se il virus può esprimere proprietà simili. L'ipotesi di lavoro, inizialmente definita come "Assurda - reductio ad absurdum", è molto probabile che sia vera.

Di seguito è suggerito (fig. 6) un nuovo modello patogenetico doppio del Virus Covid-19, evoluto. È un virus respiratorio come un "cavallo di Troia-Troian", che nel passaggio attraverso l'ospite intermedio ha probabilmente acquisito, in modo casuale e naturale, sequenze geniche semplici o piccole (micro-rna?). Tali sequenze possono sono essere simili, ma anche frazionate (modello di ricombinazione genica naturale). Saranno probabilmente trascritte simili alle originarie per forma globulare 3D, per numero di pieghe, per cariche, per il numero dei ponti di-solfuro ma soprattutto per la

posizione degli amminoacidi chiave lungo la catena proteica. Non necessariamente dovranno avere la stessa lunghezza amminoacidica. Potranno essere più corte purché si adattino con almeno due o più facce al sito accettore dei recettori colpiti, rispettando le regole dei loop, delle cariche elettrostatiche e amminoacidi chiave per il legame all'interfaccia Si definisce la sintesi di tali molecole come "fattori". Potremmo immaginare questo meccanismo molto simile al principio dell'Aufbau degli orbitali atomici, con la distribuzione degli elettroni secondo la regola di Hund (84). L'interazione fattori con i recettori potenzia indirettamente la viremia. Definiremo tali molecole "I fattori del punto zero". Si innesca un circuito (loop): più è veloce la viremia e la replicazione del virus, più fattori/tossine sono tradotte e più aumenterà la viremia grazie all'azione di quest'ultime sul sitema immunitario. D'altro canto, anche il sistema immunitario presenta notevoli variazioni interindividuale per età, genetica, patologie ed ecc. Più il sistema immunitario impiega tempo a produrre anticorpi contro il virus, più i fattori sono liberati in circolo e più il sistema immunitario è bloccato dalla doppia azione sinergica della viremia e dei fattori. In questo circuito le condizioni determinanti saranno il tempo di esposizione, la carica virale inziale e/o ripetuta (n° particelle virali/ Volume d'aria inspirata). Più è lunga l'esposizione, frazionata o non, semplice o ripetuta, più sarà alta la carica inziale e più l'out-come sarà subordinato allo stato tossico raggiunto, all'efficienza del sistema immunitario, degli enzimi incriminati (aChE e buChE) e delle terapie antivirali e di supporto adottate. Il virus utilizza la sua avidità per i recettori ACE2. I "Zero-point Factors" agirebbero a livello delle sinapsi colinergiche centrali e periferiche, e sui recettori nicotinici, sui fattori della coagulazione potenziando la patogenicità del virus COVID-19. Sarebbero quindi maggiormente a rischio: i soggetti, con over espressione dei rec-ACE2 (assunzione di farmaci) a livello polmonare; gli operatori sanitari, per l'aumento del tempo di esposizione; gli individui con un basso sistema immunitario (oncologici, patologie autoimmunitarie, in trattamento con immunosoppressori, ecc.); soggetti affetti da patologie cardiache e respiratorie (per la tossicità sia dei fattori prodotti e sia della viremia); gli individui con bassi livelli o alterato funzionamento delle colinesterasi (diversa per età, sesso, razza e fenotipo); individui con malattie neuronali tipo Parkinson (PD), Alzheimer (AD), ecc. o autoimmunitarie come la Miastenia Gravis, in trattamento con inibitori dell'acetil-colinesterasi; lavoratori (coltivatori) con esposizione stagionale ai composti organo

fosforici (pesticidi) e similari. Non è esclusa la possibilità di un unico fattore che manifesti affinità recettoriale dose/dipendente prima verso le colinesterasi e successivamente a dosi incrementate, viremia dipendente, verso i recettori nicotinici ad azione bloccante. L'out-come dipenderebbe dal doppio meccanismo d'azione dell'agente patogeno: da un lato gli elementi della viremia e dall'altro i fattori della tossicità.

Conclusioni.

Le terapie attualmente praticate sono: Lopinavir/ Ritonavir, Chloroquine, Remdesivir, Ribavirin Synthetic, Oseltamivir, Penciclovir/Acyclovir, Ganciclovir, Favipiravir (2, 30). Le terapie attualmente in sperimentazione sono: Darunavir/cobicistat; Lopinavir/ritonavir; Tocilizumab (83).

Le tossine sono in genere debolmente immunogeniche e quindi spesso non sono efficacemente prese di mira dalle attuali terapie antivenom policionali (31). Le *imitazioni di nAChR*, note anche come proteine leganti acetilcolina (AChBP), possono catturare le tossine e quindi essere usate per combattere l'envenoming neurotossico (31). In attesa di una soluzione vaccinale contro gli antigeni di superfice del virus, valida fin quando il virus non muterà le sue caratteristiche di riconoscimento, sarebbe opportuno prendere in esame i dati suggeriti e considerare i prodotti ematici convalescenti (CBP) in quanto agirebbero non solo contro l'agente patogeno Covid-19 ma anche verso i probabili fattori da esso prodotti (22). Potrebbe essere studiata la somministrazione del derivato di colinesterasi umana huBuChE (im) (40), come coadiuvante. L'utilizzo di una linea di anticorpi monoclonali, probabilmente diretta sia verso gli antigeni di superficie del virus e/o sia verso i fattori estranei trascritti da esso, potrebbe essere una soluzione immediata e consentire di contenere i tassi di mortalità. Alcuni autori studiando l'utilizzo del bromuro di Piridostigmina e l'huperzina A contro gli avvelenamenti da agenti nervosi (GD), hanno attuato un protocollo veloce per il dosaggio delle colinesterasi, con l'ausilio del test su sangue intero WRAIR WB, brevetto USA n. 6.746.850 (45). Sia quest'ultimo che il test di funzionalità, inibizione della dubicaina (41-42) potrebbero essere associati al tampone nasale e/o orofaringeo (tempo e operatore sensibile), potrebbero essere usati come criterio e parametro per definire la degenza e l'out-come dei pazienti, per stratificare il rischio e per integrare le possibilità terapeutiche. La PLA2 può essere dosata con il Abcam Secretory PLA2 Assay Kit ab133089 o conaltri test similari. Tali test potrebbero

rappresentare un valido strumento di intercettazione, di monitoraggio e di valutazione clinica. La proteina S100 potrebbe essere associata, per verificare l'out-come dei pazienti sottoposti a ventilazione meccanica (42). L'identificazione della genesi, del "punto-zero", rimane il momento cruciale e fondamentale. Il sillogismo ,"reductio ad absurdum", si semplifica nel seguente schema: I beta coronavirus possiedono la X; alcuni serpenti producono Y*Z; il covid-19 ha sicuramente un parente intermedio; il signor Blast dice che il covid-19 e le tossine dei serpenti sono probabilmente parenti; Il virus Covid-19 è un beta coronavirus e ha X+Y*Z. Ne deriva il Sillogismo finale: il virus Covid-19 può essere un beta coronavirus con dei fattori tossici. Può sembrare una logica basilare ma i dati blast integrati con le osservazioni suggeriscono tale conclusione. Lo studio del sistema nervoso autonomo è complesso e pieno di meccanismi molecolari, sub molecolari, atomici, ancora sconosciuti. Le attuali conoscenze risultano fondamentali per differenziare e catalogare meglio la manifestazione dei sui sintomi. Alcuni segni e/o sintomi di questo magnifico sistema ancestrale pur passando inosservati, potrebbero permettere di eseguire un processo induttivo inverso, ossia dalla fine al probabile inizio. La conoscenza storica delle sperimentazioni cliniche, delle ricerche, l'analisi dei modelli acquisiti dal regno animale e vegetale e di come essi interagiscono con gli altri esseri viventi può essere d'ausilio al pari dell'integrazione delle branche mediche, matematiche, epidemiologiche, fisiche e chimiche nel comprendere meglio il nostro sistema autonomo e le sue funzioni.

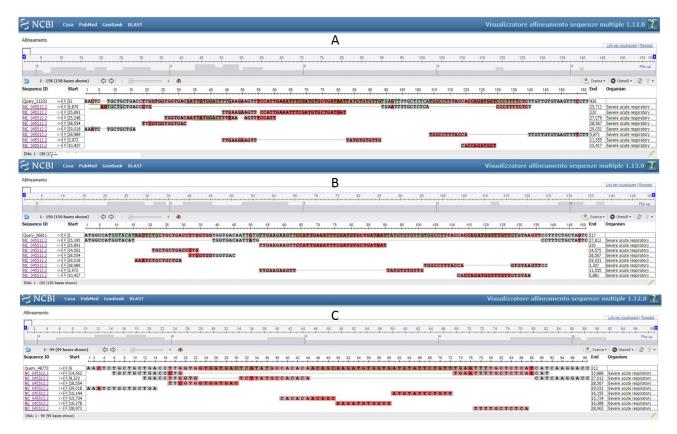


Fig 1. B. multicinctus peptide 1 simile alla neurotossina (NL1) (X64593.1), Query cover 32%, evalue 0.5, percentuale identità 100% (fig. 1A); Cardiotoxin VII Naja atra (id. U42584.1), Q.C. 26%, e-v. 0.048, per. Id. 100% (fig 1B); Bungarotossina (V31) Bungarus multicinctus alfa- (id. Y17057.1) Q.C 31%, e-v.0,092 per. Id 89.47% (fig 1C)

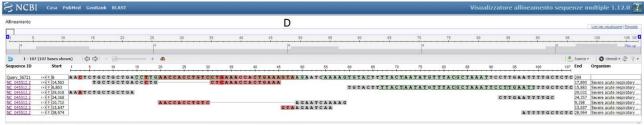


Fig 2.D Clone pGEMT-BMNTL4 Bungarus multicinctus AJ007764.1

Titolo di lavoro	Sequenza di nucleotidi	Filtra i risultati
RID	TVETC23Y01R La_ricerco scode il 03-28 olie 16:37 Scarica tutto ❤	Organismo sole coperirá see 20 escludere
Programma	BLASTN O CITAZIONE Y	Committee of the commit
Banca dati	ref_viruses_rep_genomes	Digitare il nome comune, binomiale, tassid o il nome del gruppo
ID query	LCL Query_43275	+ AggiungLorganismo
Descrizione	Nessuna	Identità percentuale Valore E Copertura richieste
Tipo di molecola	dna	a a a
Lunghezza query	264	Filtro Ripristina
Altri rapporti	Albero della distanza dei risultati Visualizzatore. MSA •	F
descrizioni	Riepilogo grafico allineamenti Tassonomia	_
Sequenze c	he producono allineamenti significativi	Scarica ' Gestisci colonne ' Mostrare 100 '
seleziona	tutto 1 sequenze selezionare	GenBank Grafica Albero dei risultati della distanza
	Descrizione	Punteggio Punteggio Query Valore Per. massimo totale Cover E. Ident accessione
Grave sins	frome resolratoria acuta coronavirus 2 isolato Wuhan Hu-1 - genoma completo	25.7 272 32% 0.14 93.75% NC_085512.2
≥ NCBI	Pubmid Continue SCASY	Visualizzatore all'incamento sequenze multiple 1.11.1
Altreations		
D 1-M (M boss dos		
Separate ID North	11 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	H H H U U U U U U U U U U U U U U U U U
10 mm	TOTACTACA TO TRANSPORT TOTACTACA TOTACA TOTAC	ARRECATTERART ARRECATTERART 13.00 June pole sporter

fig 2.E -Alpha-bungarus 3ftx Type II CAB51841.1

Fig.2 Clone pGEMT-BMNTL4 Bungarus multicinctus mRNA (id.AJ007764.1) Q.C. 33%, e-v 0,092 per. Id. 100,00% (fig 2.D); Alfa- bungarus3ftx Type II (id.CAB51841.1) Query 32%, e-v. 0.14, per.Id. 93,75% (fig. 2.E).

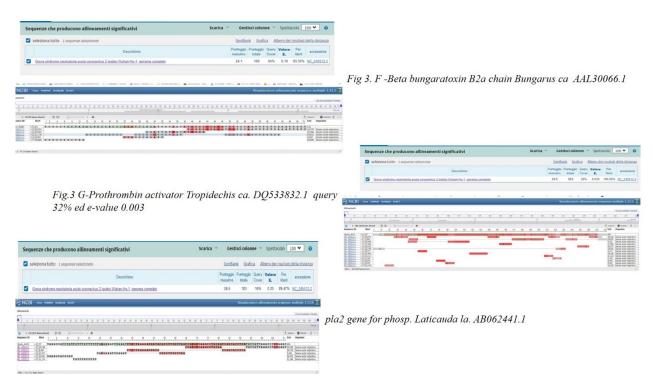


Fig 3 Beta bungaratoxin B2a chain Bungarus ca. (id.AAL30066.1) Q.C. 54%, e-v. 0.19, per.id. 93,33% (fig 3 F);Prothrombin activator Tropidechis ca. (id.DQ533832.1) Q.C. 32%, e-v. 0.003, per.id. 100% (fig 3.G);PLA2 gene for phosp. Laticauda la. (id.AB062441.1) Q.C. 16%, e-v. 0.2,

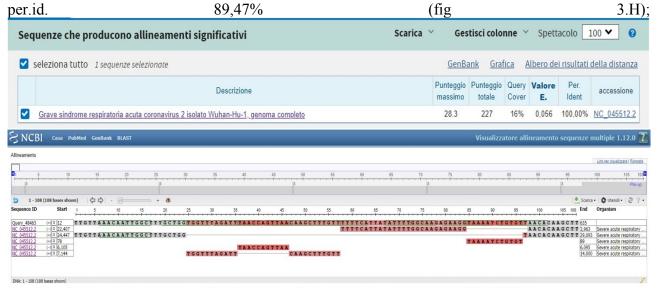


Fig.4 - gene precursor di Ophiophagus hannah Ohanin (king naja), DQ103590.1

Fig. 4 Gene precursor di Ophiophagus hannah Ohanin (king naja), (DQ103590.1) Q.C. 16%, e-v.0.056, id.100% (fig 4.);

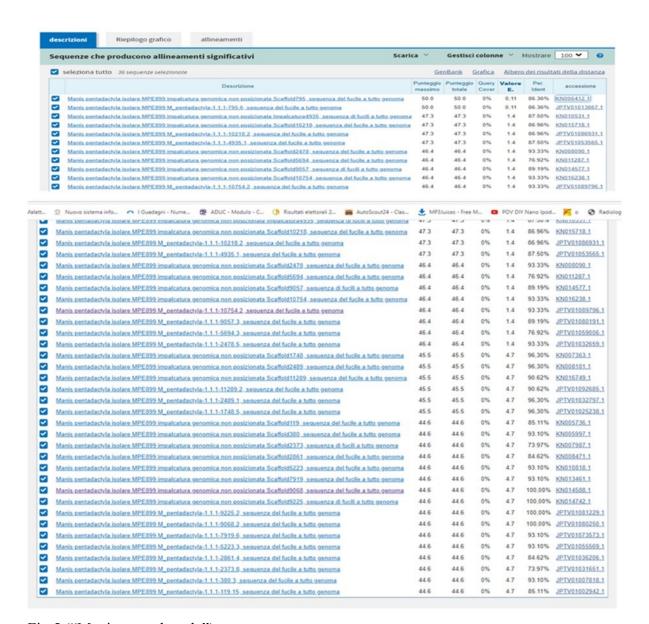


Fig 5 ("Manis pentadactyla")

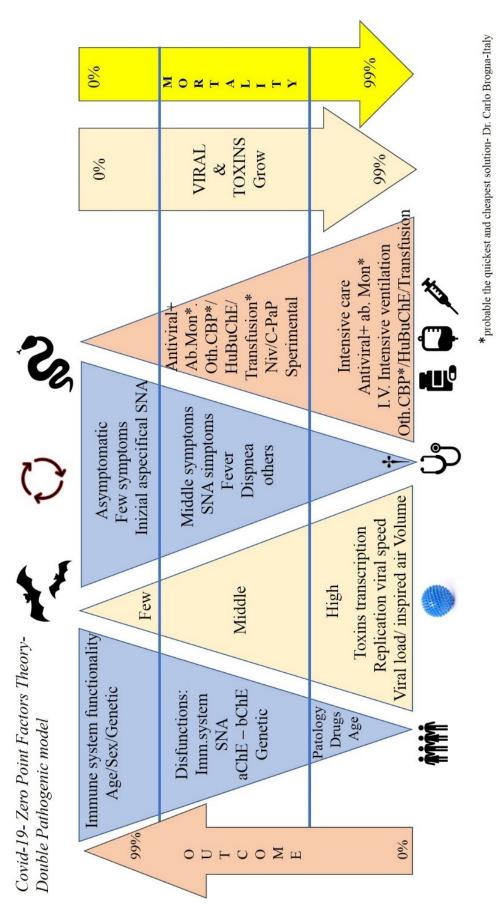


Fig 6- New Probably double pathogenic model (Dott. C. Brogna).

References:

- 1. Arinjay Banerjee, et All in Viruses 2019,11,41;(doi: 10.3390/v11010041) "Bats and Coronaviruses";
- 2. Yan-Rong Guo1† et All (The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak an update on the status- A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020;382(8): 727–33);
- 3. Giovanetti M, Benvenuto D, Angeletti S, Ciccozzi M. The first two cases of 2019-nCoV in Italy: where they come from? J Med Virol. 2020:1–4. Paraskevis D, Kostaki EG, Magiorkinis G, Panayiotakopoulos G, Sourvinos G, Tsiodras S. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. Infect Genet Evol. 2020; 79:104212;
- 4. Zhou P et All (A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 2020;
- 5. Liu Z, Xiao X, Wei X, Li J, Yang J, Tan H, et al. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. J Med Virol. 2020;
- 6. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature. 2020;
- 7. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. Nat Rev Microbiol. 2016;14(8):523–34;
- 8. Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. Viruses. 2019;11(1): E59. https://doi.org/10.3390/v11010059 e Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nat Rev Microbiol. 2019;17(3):181–92;
- 9. Angeletti S, Benvenuto D, Bianchi M, Giovanetti M, Pascarella S, Ciccozzi M. COVID-2019: the role of the nsp2 and nsp3 in its pathogenesis. J Med Virol.2020;
- 10. Zhang L, Shen FM, Chen F, Lin Z. Origin and evolution of the 2019 novel coronavirus. Clin Infect Dis. 2020. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa112 [Epub ahead of print];
- 11. Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. J Virol. 2005;79(23): 14614–21;
- 12. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS. J Virol. 2020;
- 13. Tortorici MA, et. Al 2019 Veesler D. Structural insights into coronavirus entry. Adv Virus Res. 2019; 105:93–116:
- Sawicki SG, Sawicki DL. Coronavirus transcription: a perspective. Curr Top Microbiol Immunol. 2005; 287:31–
- 15. Hussain S, Pan J, Chen Y, Yang Y, Xu J, Peng Y, et al. Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol. 005;79(9):5288–95. 36;
- 16. Perrier A, Bonnin A, Desmarets L, Danneels A, Goffard A, Rouille Y, et al. The C-terminal domain of the MERS coronavirus M protein contains a trans-Golgi network localization signal. J Biol Chem. 2019;294(39):14406–21;
- 17. Chen C, Zhang XR, Ju ZY, He WF. Advances in the research of cytokine storm mechanism induced by Corona Virus Disease 2019 and the corresponding immunotherapies. Zhonghua Shaoshang Zazhi. 2020;36(0): E005;
- 18. Liu Y, Zhang C, Huang F, Yang Y, Wang F, Yuan J, et al. 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) infections trigger an exaggerated cytokine response aggravating lung injury. 2020;
- 19. Liu Q, Wang R, Qu G, Wang Y, Liu P, Zhu Y, et al. General anatomy report of novel coronavirus pneumonia death corpse. J Forensic Med. 2020;36(1):19–21.)
- 20. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. Nat Immunol. 2010;11(5):373–84;
- 21. Wei Ji et al. 2020 | Wei Wang | Xiaofang Zhao | Junjie Zai | Xingguang Li (Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV) J Med Virol. 2020; 92:433–440;
- 22. Convalescent plasma: new evidence for an old therapeutic tool? Giuseppe Marano1, Stefania Vaglio1,2, Simonetta Pupella1, Giuseppina Facco1,3, Liviana Catalano1, Giancarlo M. Liumbruno1, Giuliano Grazzini1 Blood Transfus 2016; 14: 152-7 DOI 10.2450/2015.0131-15;
- 23. Dawei Wang , Bo Hu 1, Chang Hu , Fangfang Zhu , Xing Liu , Jing Zhang , Binbin Wang , Hui Xiang , Zhenshun Cheng , Yong Xiong , Yan Zhao , Yirong Li , Xinghuan Wang , Zhiyong Peng Affiliations expand PMID: 32031570 PMCID: PMC7042881 (available on 2020-08-07) DOI: 10.1001/jama.2020.1585 JAMA 2020 Feb 7[Online ahead of print Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China;
- 24. Huang, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu, Li Zhang, Guohui Fan, Jiuyang Xu, Xiaoying Gu, Zhenshun Cheng, Ting Yu, Jiaan Xia, Yuan Wei, Wenjuan Wu, Xuelei Xie, Wen Yin, Hui Li, Min Liu, Yan Xiao, Hong Gao, Li Guo, Jungang Xie, Guangfa Wang, Rongmeng Jiang, Zhancheng Gao, Qi Jin, Jianwei Wang†, Bin Cao† Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China Chaolin Lancet 2020; 395: 497–50;

- 25. 'Yan-Rong Guo†, Qing-Dong Cao†, Zhong-Si Hong†, Yuan-Yang Tan, Shou-Deng Chen, Hong-Jun Jin, Kai-Sen Tan, De-Yun Wang and Yan Yan) Mil Med Res . 2020; 7: 11 The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak an update on the status;
- 26. Burnouf T, Seghatchian J Transfus Apher Sci. Ottobre 2014; 51 (2): 120-5. Ebola Virus Convalescent Blood Products: Where We Are Now and Where We May Need to Go;
- 27. Vulfius et all (PLOS ONE | DOI: 10.1371/journal.pone.0115428 December 18, 2014;
- 28. Denis Servent‡§, Valérie Winckler-Dietrich‡, Hai-Yan Hu, Pascal Kessler‡, Pascal Drevet‡, Daniel Bertrand and André Ménez‡ Only Snake Curaremimetic Toxins with a Fifth Disulfide Bond Have High Affinity for the Neuronal α7 Nicotinic Receptor* (J. Biol. Chem. 272, 24279–24286;
- 29. Chiappinelli r. e all. (Dipartimento di Farmacologia, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115 Comunicato da Stephen W. Kuffler, il 21 marzo 1978;
- 30. Liying Dong, Shasha Hu, Jianjun Gao Discovering drugs to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19) Drug Discoveries & Therapeutics. 2020; 14(1):58-60;
- 31. Laura-Oana Albulescu et all Front Pharmacol. 30 lug 2019; 10: 848. doi: 10.3389 A Decoy-Receptor Approach Using Nicotinic Acetylcholine Receptor Mimics Reveals Their Potential as Novel Therapeutics Against Neurotoxic Snakebite;
- 32. Di Shoei-Yn shiau lin, chin liao e c. Y. Lee (Biochimica. J. (1977) 161.229-232 Mechanism of cardiotoxin, Protaxin and Polylisin anticholinesterase activities);
- 33. Selvanayagam Nirthanan e Matthew C.E. Gwee1 (Tre dita -Neurotossine e il recettore dell'acetilcolina nicotinica, Quarant'anni dopo Pharmacol Sci 94, 1 17 (2004);
- 34. Da c. y. lee, c. c. Chang e k. kamijo 1955 (Il Farmacologico Institute, College of Medicine, National Taiwan Univer8ity, Taipei, Formo8a, Cina, e il Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia, Graduate School of Medicine, Univeraity di Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, Stati Uniti -Ricevuto il 23 luglio 1955) Cholinesterase Inattivazione di Snake Venoms;
- 35. Edward Chia-Cheng Lai, et all (Comparative risk of pneumonia among new users of Cholinesterase Dementia Inhibitors J Am Geriatr Soc. 2015 maggio; 63(5): 869–876. doi: 10.1111/jgs.13380);
- 36. Catherine A. et all (Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors, a new facet in the Pleiotropic Activity of Snake Venom Phospholipases A2PLOS ONE | DOI: 10.1371/journal.pone.0115428 December 18, 2014);
- 37. Vivitri Prasasty, Muhammad Radifar ed Enade Istyastono (Natural peptides in targeting for the discovery of Acetilcholinesterase drugs- Molecules 2018, 23, 2344; doi: 10.3390/molecules23092344www.mdpi.com/journal/molecules);
- 38. Masahiro Seo et all, (Prognostic Significance of Serum Cholinesterase Level in Patients With Reduced, Mid-Range and Preserved Left Ventricular Ejection Fraction With Acute Decompensated Heart Failure: A Prospective Study in Osaka Prefectural Acute Heart Failure Registry (OPAR) Circulation. 2018;138: A12826;
- 39. AA.VV (Influence of age, sex and oral contraceptives on the activity of cholineesterase in human blood Clinical Chemistry, Volume 21, Issue 10, 1 settembre 1975, Pagine 1393–1395);
- 40. Mumford H (Human Plasma-Derived BuChE as a Stoichiometric Bioscavenger for Treatment of Nerve Agent Poisoning Chem Biol Interact, 203 (1), 160-6 2013 Mar 25;
- 41. P. DE LONLAY (Ottobre 2006 ORPHA:132) ultima revisione: Butyrylcholinesterase deficiency Orphanetwww.orpha.net> consor> cgi-bin.;
- 42. T. Yardan, et all (The Role of Serum Cholinesterase Activity and S100B Protein in the Evaluation of Organophosphate Poisoning) Hum Exp Toxicol, 32 (10), 1081-8 Ottobre 2013;
- 43. Chen et all 2008 (Prognostic value of sieric cholineesterase silky activities in patients poisoned by organophosfati j. ajem.2008.07.006);
- 44. Shenhar et all. (Cholineesterase as biomarkers for parasympathetic dysfunction and inflammation-related diseaseJ Mol Neurosci, 53 (3), 298-305 Lug 2014);
- 45. Gordon Richard K Gordon, Julian R Haigh, Gregory E Garcia, Shawn R Feaster, Michael A Riel, David E Lenz, Paul S Aisen, Bhupendra P Doctor Affiliations expand et all (Oral administration of pyridostigmine bromide and Huperzine A protects whole human blood cholineesterases from ex Vivo exposure to Soman Chem Biol Interact, 157-158, 239-46 15 dicembre 2005);
- 46. Nigel H. Greig, Marcella Reale, e Ada Maria Tata (New advances in pharmacological approaches to the cholinergic system: a overview of the mucarinic receptor ligands and the Cholinesterase Recente Pat CNS Drug Discov. 2013 ago; 8 (2): 123–141);
- 47. (Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. Giapponese J Pharmacol. 2001; 85: 2–10.;
- 48. (Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Immune system neurology: Neural reflexes regulate immunity. Neurone. 2009; 64: 28–32.);
- 49. Ragheb F, Molina-Holgado E, Cui QL, et al. Caratterizzazione farmacologica e funzionale dei sottotipi di recettori muscarinici nello sviluppo di oligodendrociti. J Neurochem. 2001; 77: 1396–1406;
- 50. De Angelis F, Bernardo A, Magnaghi V, Minghetti L, Tata AM. Sottotipi di recettori muscarinici come potenziali bersagli per modulare la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione dei progenitori degli oligodendrociti. Dev. Neurobiol. 2012; 72: 713–728;

- 51. Oki T, Maruyama S, Takagi Y, Yamamura HI, Yamada S. Characterization of muscarinic receptor binding and inhibition of salivation after oral administration of tolterodine in mice. Europ J Pharmacol. 2006; 529:157–163;
- 52. Racke K, Jurgens UR, Matthiesen S. Control by cholinergic mechanisms. Eur J Pharmacol.2006;533:57–68.; Racke K, Matthiesen S. The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. Pulm Pharmacol Ther. 2004; 17:181–198.;
- 53. Keam SJ, Keating GM. Tiotropium bromide. A review of its use as maintenance therapy in patients with COPD. Treat Resp Med. 2004; 3:247–268;
- 54. Darvesh S, Hopkins D, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. Nat Rev Neurosci. 2003; 4:131–138. <u>Darvesh</u> S, Cash MK, Reid GA, Martin E, Mitnitski A, Geula C. Butirylcholinestarase in associated with β-amyloid plaques in the transgenic APPSW/PSEN1dE9 mouse model of Amlzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2012 Jan; 71:2–14. <u>Darvesh</u> S, Grantham DL, Hopkins DA. Distribution of butyrylcholinesterase in human amygdala and hippocampal formation. J Comp Neurol. 1998; 393:374–390 Darvesh S, Reid GA, Martin E. Biochemical and histochemical comparison of cholinesterases in normal and Alzheimer brain tissues. Curr Alzheimer Res. 2010; 7:386–400;
- 55. Soreq H, Zakut H. Human Cholinesterases and Anticholinesterases. New York: Academic Press; 1993.; Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase New roles for an old actor. Nat Rev Neurosci. 2001; 2:294–302.;
- 56. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in brain cholinesterase in senile dementia of Alzheimer's type. Neuropathol Applied Neurobiol. 1978; 4:273–277;
- 57. Wright CI, Geula C, Mesulam MM. Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. Ann Neurol. 1993; 34:373–384.;
- 58. Eng LF, Uyeda CT, Chao LP, Wolfgram F. Antibody to bovine choline acetyltransferase and immunofluorescent localisation of the enzyme in neurons. Nature. 1974; 250:243–245;
- 59. Greig NH, Sambamurti K, Yu QS, Perry T, Holloway HW, Haberman F, et al. In: Butyrylcholinesterase its Function and Inhibitors. Giacobini E, editor. London: Martin Dunitz; 2003.pp. 69–90;
- 60. Greig N, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry T, et al. A new therapeutic target in AD treatment: Attention to butyrylcholinesterase: Cur Med. Res Opinions. 2001; 17:1–7;
- 61. Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. International Psychogeriatrics. 2002; 14:77–91;
- 62. Masson P, Carletti E, Nachon F. Structure, activities and biomedical applications of human butyrylcholinesterase. Protein Pept Lett. 2009; 16:1215–1224 151;
- 63. Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: how is structure related to function? Chem Biol Interact. 2008; 175:3–10;
- 64. Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science. 1991; 253:872–879);
- 65. Antil-Delbeke1, C Gaillard, T Tamiya, P J Corringer, J P Changeux, D Servent, A Ménez Affiliations expand PMID: 10852927 DOI: 10.1074/jbc.M909746199 J Biol Chem 275, 29594-601 2000 Sep 22 Molecular Determinants by Which a Long Chain Toxin From Snake Venom Interacts With the Neuronal Alpha 7-nicotinic Acetylcholine Recepto S;
- 66. Antil, S., Servent, D. e Ménez, A. (1999) J. Biol. Chem. 274, 34851-34858);
- 67. Ackermann, EJ, Ang, ETH, Kanter, JR, Tsigelny, I. e Taylor, P. (1998) J. Biol Chem. 273, 10958-10964);
- 68. Osaka, H., Malany, S., Molles, BE, Sine, SM, e Taylor, P. (2000) J. Biol. Chem. 275, 5478-5484;
- 69. D Servente, G Mourier, S Antil, A Ménez SMED Expansion Affiliates: 10022254 DOI: 10.1016 / s0378-4274 (98) 00307-5 Toxicol Lett, 102-103, 199-203 28 December 1998 How tome toxins curemimetic snakes discriminate against nicotinic acetylcholine receptor subtypes;
- 70. André Ménez (dal libro La struttura delle tossine degli animali velenosi) LE SCIENZE n. 305, gennaio 1994;
- 71. STOCKER K. (a cura), Serpents, venins, envenimations, Société Herpétologique de France, Edition Fondation Marcel Mérieux, 1987.;
- 72. Medical Use of Snake Venom Proteins, CRC Press, Boca Raton, 1990;
- 73. Harvey, Pergamon Press, 1991Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, a cura di A. H.;
- 74. MENEZ A. e altri, in «Proceedings of the Royal Society of Edinburgh», 99B, pp. 83-102, 1992.;
- 75. BONTEMS F. e altri, in «Science», n. 254, pp. 1521-1523.;
- 76. R Manjunatha Kini nel "Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (2002) 29, 815–822;
- 77. Aisha Munawar, Syed Abid Ali, Ahmed Akrem and Christian Betzel presentano una review dal titolo "Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery" Toxins 2018, 10, 474; doi:10.3390/toxins10110474;
- 78. Harald k.l.et all. Van den born,',3 zoran radic,'*' pascale marchot,'v4 palmer taylor,' and igor tsigelny's2 "Theoretical analysis of the structure of the peptide fasciculin and its docking to acetylcholinesterase". Protein Science (1995), 4:703-715. Cambridge University Press. Printed in the USA.;

- 79. Venaa RAO*, Jeremiah S. JOSEPH† and R. Manjunatha KINI*‡Biochem. J. (2003) 369, 635–642 (Printed in Great Britain) 635 Group D prothrombin activators from snake venom are structuralhomologues of mammalian blood coagulation factor Xa Veena S1;
- 80. M. Chatterjee; M. Manke; M. Cebo; J. Rheinlaender; A. Witte; T. Schäffer; M. Lämmerhofer; O. Borst; M. Gawaz Recettore piastrinico della chemochina CXCR7 Media un effetto antitrombotico e antitrombinfiammatorio Res Pract Thromb Haemost. Luglio 2018; 2 (Suppl 1): 1–368.Pubblicato online il 5 luglio 2018: 10.1002 / rth2.12125;
- 81. E.K. Perry, R.H. Perry, C.J. Smith, D. Purohit, J. Bonham, D.J. Dick, J.M. Candy, Cholinergic Receptors inCognitive Disorders J. A. Edwardson and A. Fairbairn Can. J. Neurol. Sci. 1986; 13:521;
- 82. Manual Goodman & Gilman. Le basi farmacologiche della terapia di Laurence L. Brunton, Randa Hilal-Dandan, e al. | 2018;
- 83. Note AIFA Italia dal 11 Marzo in poi https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1131319/covid-19 sperimentazioni in corso 27.03.2020.pdf/b2391bac-7920-0945-51a1-66db453053cf.
- 84. Iupac. A compendium of chemical terminology, 2nd ed. (the "Golden Book"). Compiled by AD McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by SJ Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. https://doi.org/10.1351/goldbook
- 85. 1 Burke, J.E.; Dennis, E.A. Phopholipase A2 structure/function, mechanism and signaling. J. Lipid Res. 2008, 50, S237–S242.
- 86. Dennis, E.A.; Cao, J.; Hsu, Y.-H.; Magrioti, V.; Kokotos, G. Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition and therapeutic
- 87. Raoudha Zouari-Kessentini, Najet Srairi-Abid, Amine Bazaa, Mohamed El Ayeb, Jose Luis, and Naziha Marrakchi. Antitumoral Potential of Tunisian Snake Venoms Secreted Phospholipases A2 Biomed Res Int. 2013; 2013: 391389. Published online 2013 Jan 31. doi: 10.1155/2013/391389 PMCID: PMC3581298 PMID: 23509718
- 88. John B. Harris[†], and Tracey Scott-Davey Secreted Phospholipases A2 of Snake Venoms: Effects on the Peripheral euromuscular System with Comments on the Role of Phospholipases A2 in Disorders of the CNS and Their Uses in Industry Toxins (Basel). 2013 Dec; 5(12): 2533–2571. Published online 2013 Dec 17. doi: 10.3390/toxins5122533 PMCID: PMC3873700 PMID: 24351716
- 89. E. A. Dennis, "Phospholipase A2 in eicosanoid generation," *American Journal of Respiratory and Critical CareMedicine*, vol. 161, no. 2, part 2, pp. S32–S35, 2000.
- 90. T. J. Shuttleworth, "Arachidonic acid activates the noncapacitative entry of Ca2+ during [Ca2+] *i* oscillations," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 36, pp. 21720–21725, 1996.
- 91. M. N. Graber, A. Alfonso, and D. L. Gill, "Ca2+ pools and cell growth: arachidonic acid induces recovery of cells growtharrested by Ca2+ pool depletion," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 2, pp. 883–888, 1996
- 92. C. D. Funk, "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology," *Science*, vol. 294, no. 5548, pp. 1871–1875, 2001
- Catarina Teixeira, Cristina Maria Fernandes, Elbio Leiguez, and Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, Inflammation Induced by Platelet-Activating Viperid Snake Venoms: Perspectives on Thromboinflammation Immunol. 2019;
 2082. Published online 2019 Sep 4. doi: 10.3389/fimmu.2019.02082 PMCID: PMC6737392 PMID: 31572356
- 94. M. Goppelt-Struebe, D. Wolter, and K. Resch Glucocorticoids inhibit prostaglandin synthesis not only at the level of phospholipase A2 but also at the level of cyclo-oxygenase/PGE isomerase. Br J Pharmacol. 1989 Dec; 98(4): 1287–1295. doi: 10.1111/j.1476-53811989.tb12676.x PMCID: PMC1854794 PMID: 2514948
- 95. M. Goppelt-Struebe, D. Wolter, and K. Resch Glucocorticoids inhibit prostaglandin synthesis not only at the level of phospholipase A2 but also at the level of cyclo-oxygenase/PGE isomerase. Br J Pharmacol. 1989 Dec; 98(4): 1287–1295. doi: 10.1111/j.1476-3811989.tb12676.x PMCID: PMC1854794 PMID: 2514948
- 96. Jamie D Croxtall, Qam Choudhury,and Rod J Flower Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism Br J Pharmacol. 2000 May; 130(2): 289–298. doi: 10.1038/sj.bjp.0703272 PMCID: PMC1572055 PMID: 10807665

*Autor:

Brogna Carlo M.D.:

Achieved both titles in Medicine (Salerno University Medical school) and Dental School (Pescara University Dental School);

Specialist in oral facial pain (Pescara University Dental School) and expert in oral surgery (few period at NJDS-Usa);

Attended in Neurosurgery (thesis in "The trochlear nerve: microanatomic and endoscopic study" - Salerno University Medical school).

E-mail: c.brogna@libero.it

Montemiletto (Av)- Italy

Figura 1