

Lactoferrin as Protective Natural Barrier of Respiratory and Intestinal Mucosa against Coronavirus Infection and Inflammation

E.Campione, T.Cosio, L.Rosa.,C.Lanna, S. Di Girolamo, R. Gaziano, P. Valenti, L. Bianchi

Dermatologic Unit, Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata, 00133 Rome, Italy

Department of Public Health and Infectious Diseases, University of Rome La Sapienza, 00185 Rome, Italy

Department of Otorhinolaryngology, University of Rome Tor Vergata, 00133 Rome, Italy

Department of Experimental Medicine, University of Rome Tor Vergata, 00133 Rome, Italy

Int. J. Mol. Sci. **2020**, *21*(14), 4903

Received: 17 June 2020 / Revised: 5 July 2020 / Accepted: 9 July 2020 / Published: 11 July 2020

Riassunto

Di recente, il mondo ha affrontato una devastante infezione da coronavirus pandemico globale, con oltre 12 milioni di infetti in tutto il mondo e oltre 300.000 decessi al 15 maggio 2020, correlati a un nuovo coronavirus (2019-nCoV), caratterizzato da una morfologia sferica e identificato attraverso il sequenziamento di prossima generazione. Sebbene il tratto respiratorio sia il principale portale di entrata della SARS-CoV-2, può verificarsi anche un coinvolgimento gastrointestinale associato a nausea, vomito e diarrea. Nessun farmaco o vaccino è stato approvato a causa dell'assenza di prove derivanti da rigorosi studi clinici. È stato evidenziato un crescente interesse sul possibile ruolo preventivo e il trattamento aggiuntivo di lattoferrina, glicoproteina delle secrezioni umane parte di un sistema difensivo non

specifico, noto per svolgere un ruolo cruciale contro le infezioni microbiche e virali e esercitare effetti antinfiammatori su diverse superfici della mucosa e in grado di regolare il metabolismo del ferro. In questa recensione, analizzando le proprietà della lattoferrina, proponiamo di progettare uno studio clinico per valutare e verificare il suo effetto utilizzando un trattamento a doppia combinazione con la formulazione spray locale, solubilizzata e la somministrazione orale. La lattoferrina potrebbe contrastare l'infezione e l'infiammazione del coronavirus, agendo come barriera naturale della mucosa sia respiratoria che intestinale o ripristinando i disturbi del ferro legati alla colonizzazione virale.

Parole chiave: coronavirus; SARS; lattoferrina

1. Introduzione

Di recente, il mondo ha affrontato una devastante infezione da coronavirus pandemico globale, con oltre 45 milioni di infetti in tutto il mondo e oltre 300.000 decessi al 15 maggio 2020, correlati a un nuovo coronavirus (2019-nCoV), caratterizzato da una morfologia sferica e identificato attraverso il sequenziamento di prossima generazione. La sequenza genetica di SARS-CoV-2 mostra oltre l'80% di identità a SARS-CoV e il 50% a MERS-CoV [1,2]. Da notare che SARS-CoV-2 possiede una maggiore trasmissibilità da uomo a uomo e una bassa patogenicità rispetto a SARS-CoV [3].

Il coronavirus appartiene alla famiglia dei Coronaviridae, sottofamiglia Coronavirinae, ordina Nidovirales e questa sottofamiglia comprende quattro generi: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus [4]. Il coronavirus possiede un genoma di RNA a senso unico a filamento positivo che varia da 26 a 32 kilobasi in lunghezza [5]. Il primo frame di lettura aperto rappresenta la maggior parte del genoma virale e codifica per 16 proteine non strutturali, mentre gli

altri frame di lettura aperti codificano per proteine strutturali e accessorie [6,7]. Il genoma virale residuo è responsabile dell'espressione di quattro proteine strutturali essenziali: glicoproteina a spillo, proteina dell'involucro piccolo, proteina della matrice e proteina nucleocapside. In particolare, la glicoproteina spike (S) è composta da due subunità (S1 e S2) [6]. Gli omotrimeri delle proteine S sulla superficie virale sono responsabili del legame con i recettori ospiti (S1) e la fusione della membrana (S2) [2,8]. Una subunità S1 degna di nota, come in altri beta-coronavirus, è composta da un nucleo e un sottodominio esterno e rappresenta solo un'identità amminoacidica del 40% con altri SARS-CoV. Tuttavia, in SARS-CoV-2, la subunità S2, che contiene un peptide di fusione, un dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico, è altamente conservata. S1 interagisce direttamente con l'enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE-2), il recettore funzionale espresso sulla superficie delle cellule ospiti polmonari, cardiache, renali, intestinali ed endoteliali [2]. In particolare, le cellule parenchimali epiteliali alveolari di tipo II esprimono ACE-2.

In particolare, le cellule epiteliali nasali, che comprendono due gruppi di cellule caliciformi e un gruppo di cellule ciliate, mostrano la massima espressione tra tutte le cellule investigate nell'albero respiratorio [9]. Poiché il virus può essere rilevato nei campioni del tratto respiratorio superiore, il nasofarinx può essere coinvolto come sito di replicazione. Inoltre, SARS-CoV-2 è anche in grado di infettare i linfociti T, nonostante i loro livelli di espressione molto bassi di ACE-2, portando i ricercatori a ipotizzare la presenza di un recettore alternativo che consente l'ingresso virale in queste cellule [10]. Inoltre, gli studi hanno dimostrato che la proteasi serinica TMPRSS2 è in grado di adescare la proteina S, consentendo così la scissione della proteina spike e regolando l'intero meccanismo di ingresso virale [11]. Possono essere coinvolte anche altre proteasi [11]. La proteasi serina TMPRSS2 e la catepsina B / L, espresse da ghiandole salivari, polmoni, intestino tenue, fegato, rene e cellule endoteliali del cuore, potrebbero portare a conseguenza vasculite sistemica, tromboembolia e coagulazione intravascolare disseminata [12]. Ulteriori target

ipotetici potrebbero considerare altri componenti virali come ORF3b, non omologhi con quelli dei SARS-CoV e una proteina secreta (codificata da ORF8), strutturalmente diversa da quelli dei SARS-CoV [4].

Sebbene il tratto respiratorio sia il principale portale di entrata della SARS-CoV-2, possono verificarsi anche coinvolgimento gastrointestinale associato a nausea, vomito e diarrea e persistenza di particelle virali [4,10]. I primi studi hanno riscontrato una bassa incidenza (1-3,5%) di manifestazioni gastrointestinali o epatiche, ma studi più recenti hanno riportato un più alto tasso di affetto (11,4-24,2%).

Inoltre, nei soggetti che soffrono di SARS-CoV-2, le transaminasi possono variare da lievi a livelli elevati [13], probabilmente correlati alla presenza di recettori ACE-2 su enterociti nell'ileo e nel colon [14], colangiociti ed epatociti [15,16,17]. L'ACE-2 sembra mediare i processi infiammatori e, di conseguenza, l'insorgenza di diarrea [18]. Poiché diversi studi hanno indicato una possibile trasmissione fecale-orale, l'RNA SARS-CoV-2 deve essere rilevato nelle feci dei pazienti affetti da Covid-19 [19]. Tuttavia, non è chiaro se la SARS-CoV-2 si replica nell'intestino umano e contribuisca alla possibile trasmissione fecale-orale [18] o se l'intestino è un potenziale sito di replicazione della SARS-CoV-2, contribuendo così alla malattia locale e sistemica e globale progressione della malattia [10]. È noto che la disbiosi intestinale secondaria all'infiammazione gastrointestinale interferisce con disturbi distanti [20]. Alla luce di questo punto di vista, è stato ipotizzato un asse intestino-polmone, ad azione bidirezionale: endotossine e metaboliti microbici sintetizzati dal microbiota intestinale possono influenzare il polmone attraverso la circolazione, mentre l'infiammazione polmonare può influenzare il microbiota intestinale [21]. Pertanto, il microbiota intestinale potrebbe partecipare alla patogenesi della sindrome da distress respiratorio acuto e viceversa [22].

La maggior parte dei pazienti infetti da SARS-CoV-2 presenta sintomi da lievi a moderati, come anosmia improvvisa o ageusia, febbre, tosse anormale, mal di testa e affaticamento e diarrea e guarisce senza conseguenze. Tuttavia, circa il 15% sviluppa

una polmonite grave e un progresso del 5% nella sindrome da distress respiratorio acuto, shock settico e / o insufficienza multipla di organi, associata ad alta mortalità.

2. Omeostasi infiammatoria e del ferro

Tra i vari fattori che influenzano le infezioni virali e i relativi processi infiammatori, il ferro svolge un ruolo critico, favorendo la progressione virale da un lato e esacerbando i processi infiammatori dall'altro. In effetti, il ferro è un elemento cardine per tutte le cellule in quanto è fondamentale nella replicazione del DNA e nella produzione di energia sia nell'uomo che nei microrganismi. Quando il ferro è presente in eccesso, genera specie reattive dell'ossigeno (ROS), causando la sua capacità di rilasciare elettroni nell'ossigeno. La formazione di ROS danneggia proteine, membrane lipidiche e DNA, causando lesioni ai tessuti e insufficienza d'organo [23]. In condizioni sane, il ferro disponibile libero è presente alla concentrazione di circa 10-18 M, molto lontano da quello richiesto per la moltiplicazione microbica, la generazione di ROS e l'induzione del processo infiammatorio [24,25]. In condizioni patologiche, la concentrazione di ferro libero è superiore a 10-18 M, aumentando così la suscettibilità dell'ospite a infezioni, ROS e induzione del processo infiammatorio [25]. Il corretto equilibrio del ferro tra i tessuti / le secrezioni e il sangue, definito omeostasi del ferro, coinvolge diverse proteine del ferro, come transferrina (Tf), ferroportina (Fpn), ferritina (Ftn), lattoferrina (Lf) e epcidina, un fattore importante peptide sintetizzato dal fegato [25]. Durante le infezioni virali, l'omeostasi del ferro è perturbata, portando a disturbi del ferro [26] che sono aggravati dall'azione delle citochine pro-infiammatorie, tra cui l'interleuchina-6 (IL-6) [27]. In effetti, le infezioni e i relativi processi infiammatori, regolando l'IL-6, inducono la sintesi di epcidina, che a sua volta blocca l'efflusso di ferro mediato dalla Fpn dalle cellule al sangue, riducendo così la concentrazione sierica di ferro e aumentando il sovraccarico di ferro nelle cellule reticoloendoteliali

[28]. Coerentemente, quando il livello sierico di IL-6 aumenta, la saturazione di ferro del siero Tf, così come i livelli del recettore Tf 1 (TfR1) e Fpn, diminuiscono [27,28]. Pertanto, lo stato di ferro dell'ospite può alterare il decorso dell'infezione e la sua risoluzione. Inoltre, le infezioni virali richiedono un metabolismo cellulare attivo e, pertanto, una replicazione virale significativa richiede un'elevata disponibilità di ferro [28,29]. È un dato di fatto, i disordini dell'omeostasi del ferro tra cui la sintesi disregolata Fpn, TfR1 e Ftn portano a un sovraccarico di ferro intracellulare che facilita la moltiplicazione e la diffusione virale. Pertanto, la disregolazione del ferro, indotta dall'infezione da SARS-CoV-2 e dai relativi processi infiammatori, potrebbe anche svolgere un ruolo cruciale nell'attivazione e nella progressione della compromissione degli organi.

Nei pazienti affetti da COVID-19, la maggior parte dei casi gravi ha mostrato livelli sistemici massicci di biomarcatori e citochine infiammatorie correlate all'infezione, vale a dire IL-6 sierico, fattore di necrosi tumorale- α (TNF α) e ftn [30]. L'eccessivo rilascio di citochine proinfiammatorie, indicato come "tempesta di citochine", si è evoluto come un importante sistema di sorveglianza che, quando innescato, combatte l'infezione ed elimina i patogeni ma potrebbe contribuire come causa principale di danno agli organi interni o ai sistemi recentemente ipotizzato per shock cardiovascolare, neurologico, settico o sequele cutanee o relativi fattori di rischio per prognosi sfavorevole [31,32,33,34,35,36,37,38,39,40].

3. Opzioni terapeutiche per Covid-19

Nessun farmaco o vaccino contro SARS-CoV-2 è stato approvato a causa dell'assenza di prove derivanti da rigorosi studi clinici. Inoltre, sebbene alcuni trattamenti sembrano efficaci contro questo virus, esercitano diversi effetti avversi. Sono necessari farmaci sicuri ed efficaci per prevenire e curare la malattia di coronavirus nel 2019 (COVID-19).

Alla luce di queste considerazioni, oltre alla necessità di trovare specifici agenti antivirali sicuri o vaccini, sarebbe di fondamentale importanza aumentare le difese dell'ospite creando una barriera immunologica in grado di proteggere il tratto respiratorio superiore, considerata la principale via di accesso del virus in l'ospite, o / e la mucosa intestinale. È degna di nota l'osservazione che un numero consistente di pazienti COVID-19 presenta diarrea e più spesso segni olfattivi e gustativi, anche con sintomi respiratori assenti o lievi e un normale esame otorinolaringoiatrico. Nei pazienti sintomatici e asintomatici, i tamponi nasali hanno prodotto carichi virali più elevati rispetto ai tamponi della gola, implicando l'epitelio nasale come portale per l'infezione iniziale e la trasmissione [41], mentre diversi ricercatori stanno testando l'evidenza del virus nelle feci.

Da notare che, tra le diverse terapie, il plasma convalescente contenente anticorpi specifici contro SARS-CoV-2 può essere applicato come trattamento principale [15] secondo le linee guida della National Health Commission della Repubblica popolare cinese (National Health Commission of the People's Republic of Cina 2020. Avviso sulla stampa e distribuzione del trattamento al plasma convalescente per la nuova polmonite da coronavirus (versione di prova 2)) [42]. Tuttavia, la valutazione dell'efficacia del trattamento con plasma convalescente è ancora incerta e sono in corso studi clinici. Risultati promettenti sono stati trovati attraverso una terapia con anticorpi monoclonali, la principale classe di bioterapici per l'immunoterapia passiva, già esercitando un'interessante efficacia nel neutralizzare l'infezione da SARS-CoV e MERS-CoV [10]. Tuttavia, la produzione su larga scala di anticorpi monoclonali è laboriosa, costosa e richiede molto tempo. La vaccinazione, basata su vaccini inattivati, vaccini di subunità ricombinanti, vaccini a base di acido nucleico, vaccini di vettori adenovirali e vaccini di vettore virale influenzale ricombinante, è la strategia più efficace per prevenire e controllare la COVID-19, in particolare utilizzando come bersaglio la proteina S [43]. Inoltre, sono stati caratterizzati un set schermato di epitopi di cellule B e T derivati dalla SARS-CoV e sarebbe cruciale per

la fase iniziale di sviluppo del vaccino [44]. Inoltre, per fornire risultati affidabili sull'efficacia del plasma e dei vaccini convalescenti, sono stati proposti diversi farmaci per ridurre i processi iperinflamatori durante COVID-19 e / o inibire l'ingresso e la fusione di SARS-CoV-2.

È un dato di fatto, in alcuni pazienti infetti da SARS-CoV-2, una disregolazione della risposta immunitaria porta a una condizione iperinflamatoria. Percentuali più elevate di cellule T granulocite-macrofagi stimolanti il fattore positivo (GM-CSF +) e IL-6 + CD4 + T sono state osservate su pazienti in unità di terapia intensiva (ICU) rispetto ai pazienti non-ICU con COVID-19, indicando così che la tempesta di citochine è associata alla gravità della malattia [30]. L'inibizione dell'eccessiva risposta infiammatoria da parte dei corticosteroidi può rappresentare una terapia aggiuntiva per COVID-19, anche se la loro efficacia contro questa malattia è ancora controversa [45]. Le molecole putative antivirali si concentrano sui componenti strutturali del CoV, rappresentati per lo più dalle due subunità spike sulla superficie virale, che regolano il legame con i recettori ospiti. Altri farmaci inibiscono l'ingresso di SARS-CoV-2. Come già riportato, la proteina S1 della SARS-CoV-2 media l'ingresso nelle cellule ospiti [46] attraverso il legame con il recettore ACE-2 [41]. Tuttavia, è stato suggerito che la voce SARS-CoV-2 dipende non solo dall'ACE-2 ma anche dalla proteasi serinica della cellula ospite TMPRSS2 [11]. SARS-CoV-2 si lega al recettore ACE-2 attraverso la subunità S1 N-terminale [11,47,48], che viene successivamente scissa dalla transmembrana serina proteasi 2 (TMPRSS2) ospite per esporre la subunità S2 C-terminale che induce fusione virus-cellula [11,49]. Un inibitore di TMPRSS2, camostat mesilato, sembra ridurre significativamente l'infezione della linea cellulare polmonare in vitro con SARS-CoV-2, suggerendo così un trattamento putativo contro COVID-19 [11]. Inoltre, è stato anche suggerito che il trattamento con arbidol è in grado di inibire l'ingresso del virus. Per quanto riguarda il trattamento con cloroquina, un farmaco antimalarico tradizionale, la sua efficacia contro la SARS-CoV-2 è stata dimostrata in vitro [50]. Sono in corso studi clinici,

anche se il meccanismo d'azione della cloroquina è ancora sconosciuto, mentre la sua tossicità è ben nota. Infine, sono stati sviluppati diversi agenti antivirali contro proteasi virali, polimerasi, MTasi e proteine di ingresso [3]. Nel complesso, l'immunoterapia con anticorpi IgG immunitari combinati con farmaci antivirali può essere un trattamento alternativo contro COVID-19 fino a quando non saranno disponibili opzioni più forti come i vaccini.

Pertanto, è urgentemente necessario esplorare metodi alternativi per il trattamento, senza effetti avversi, di condizioni clinicamente avanzate di COVID-19 al fine di ridurre l'infezione virale, la replicazione e la diffusione, nonché la mortalità, e di mitigare i potenziali focolai futuri, prima del set -up di vaccino. L'ipotesi di identificare molecole naturali, che, senza effetti collaterali, sono in grado di aumentare le difese locali dell'ospite o di inibire l'infezione virale e di ripristinare i disordini dell'omeostasi infiammatoria e del ferro, è estremamente allettante.

4. Lattoferrina

Studi recenti hanno dimostrato che i componenti delle secrezioni umane, appartenenti all'immunità innata, sono elementi chiave delle difese dell'ospite che agiscono come barriera cardine contro la lesione virale [25,51,52]. Recentemente è stato messo in luce l'interesse crescente sul possibile ruolo preventivo e sul trattamento aggiuntivo della lattoferrina [53], una glicoproteina di secrezioni umane che fa parte di un sistema difensivo non specifico, noto per svolgere un ruolo importante contro le infezioni microbiche e virali e l'esercizio effetti antinfiammatori su diverse superfici delle mucose e in grado di regolare il metabolismo del ferro [25,51].

La lattoferrina (Lf), appartenente alla famiglia Tf, è in grado di chelare in modo reversibile due Fe (III) per molecola con elevata affinità ($K_d \sim 10^{-20}$ M). È una glicoproteina cationica di ca. 690 residui di aminoacidi. A differenza di Tf, che rilascia ferro a valori di pH inferiori a 5,5, Lf lega il ferro ferrico fino a valori di pH

di circa 3,0. Lf umana (hLf), una molecola dell'immunità innata, è costitutivamente secreta dalle ghiandole esocrine e dai neutrofili nei siti di infezione e infiammazione (106 neutrofili rilasciano 15 μg di Lf) [25,54,55]. Anche se Lf è altamente conservato tra specie diverse, l'omologia della sequenza più alta è stata riconosciuta tra lattoferrina umana e bovina (bLf) (circa il 70%) [56]. bLf e hLf hanno identiche funzioni biologiche [25] e, pertanto, bLf è stato applicato in studi in vitro e in vivo, essendo generalmente riconosciuto come sicuro (GRAS) dalla Food and Drug Administration (FDA) e disponibile in grandi quantità. Le varie funzioni sono associate alla sua capacità di chelare due ioni ferrici e di legarsi a superfici anioniche [57]. Ha una potente attività antinfiammatoria e immunomodulante [48,49,58]. L'attività antinfiammatoria di Lf dipende dalla sua capacità di entrare, attraverso l'endocitosi mediata dai recettori, all'interno delle cellule ospiti e di traslocare nel nucleo [59], regolando così l'espressione genica pro-infiammatoria [60,61]. Lf, attraverso la sua attività antinfiammatoria e le proprietà immunomodulatorie, è anche in grado di down-regolare le citochine pro-infiammatorie e potenziare la risposta immunitaria adattativa. Inoltre, la capacità di Lf nel contrastare e ripristinare i disturbi del ferro, modulando la risposta immunitaria e le citochine pro-infiammatorie down-regolanti, come l'IL-6, è stata dimostrata sia in vitro [62,63] che in vivo [64,65] modelli, nonché in studi clinici [66,67]. È stato dimostrato che Lf agisce come uno scavenger contro il sovraccarico di ferro e l'infiammazione nell'epitelio polmonare di topi infetti da *Pseudomonas aeruginosa* [64,65], e bLf è stato trovato per riequilibrare le proteine di manipolazione del ferro polmonare e ridurre il ferro bronco-alveolare sovraccarico, uno dei principali attori nella progressione e nell'esacerbazione dell'infezione [65]. Diversi studi hanno descritto l'attività antivirale di Lf nei confronti di virus avvolti e nudi, correlati a diverse famiglie di virus, come Retroviridae (virus dell'immunodeficienza umana), Papillomaviridae (papillomavirus umano), Herpesviridae (Cytomegalovirus, Herpes simplex virus), Caliciviridae (calicivirus felino), Flaviviridae virus dell'epatite C, virus encefalite giapponese 71,

echovirus 6), Togaviridae (Alphavirus) e Geminiviridae (virus dell'arricciatura fogliare giallo pomodoro) [68,69]. bLf è stato trovato per ostacolare l'ingresso virale nelle cellule ospiti attraverso il suo legame competitivo con i recettori della superficie cellulare, principalmente composti caricati negativamente come glicosaminoglicani (GAG) [68,70,71,72,73,74,75]. Inoltre, è stato scoperto che Lf previene le infezioni virali legandosi ai recettori non integrinici (DC-SIGN) e LDL afferenti alla molecola di adesione intercellulare specifici per cellula dendritica [76,77].

Nel complesso, l'effetto antivirale di Lf si verifica nella fase iniziale dell'infezione, impedendo l'ingresso di particelle virali nelle cellule ospiti, bloccando i recettori cellulari e / o legandosi direttamente alle particelle virali. Inoltre, Lf è anche in grado di esercitare un'attività antivirale quando viene aggiunto nella fase post-infezione, come dimostrato nell'infezione da Rotavirus da Superti et al. [78] e nell'infezione da HIV di Puddu et al. [79]. Se l'efficacia nella fase post-infezione ci induce a ipotizzare che questa glicoproteina sia anche efficace nell'interferire con la fase intracellulare dell'infezione da virus.

Complessivamente, Lf esercita la sua attività antivirale contro la maggior parte dei virus testati legandosi all'eparina solfato, mentre contro pochi virus interagendo con i componenti superficiali delle particelle virali [68,69]. In particolare, Lf si lega alle proteine E1 ed E2 dell'HCV [80], alla proteina F dell'RSV [81] e alla proteina gp120 dell'HIV [79]. Inoltre, Lf interagisce sia con particelle virali che con cellule ospiti quando esercita la sua attività antivirale contro Echovirus 6 [82]. La capacità di Lf di esercitare attività antivirale, legandosi alle cellule ospiti o particelle virali o entrambe, rafforza l'idea che questa glicoproteina sia "un importante mattone nella parete della mucosa, efficace contro gli attacchi virali" [57]. È importante ricordare che Lang e colleghi hanno studiato il ruolo di Lf nell'ingresso dello pseudovirus SARS nelle cellule Myc. I loro risultati rivelano che Lf è stato in grado di bloccare il legame della proteina spike con le cellule ospiti, indicando che Lf ha esercitato la sua funzione inibitoria nella fase di attacco virale [83]. Tuttavia, Lf non ha bloccato l'ingresso del

virus mediante l'interazione diretta della proteina spike con ACE-2, il recettore funzionale di SARS-CoV [83] e SARS-CoV-2 [41]. L'attuale modello accettato suggerisce che Lf potrebbe bloccare l'ingresso virale interagendo con i proteoglicani eparan solfato (HSPG), che mediano il trasporto di particelle di virus extracellulari dai siti di ancoraggio a bassa affinità all'entrata specifica ad alta affinità come ACE-2 [84]. Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che Lf potrebbe svolgere un ruolo protettivo nella difesa dell'ospite contro l'infezione da SARS-CoV-2 attraverso il legame con gli HSPG, bloccando così l'interazione precoce tra SARS-CoV-2 e cellule ospiti. Inoltre, la capacità di Lf di entrare all'interno del nucleo può anche contrastare l'attivazione della tempesta di citochine, evitando così l'omeostasi sistemica, polmonare o intestinale del ferro e l'esacerbazione della malattia. Recentemente, è stato dimostrato l'effetto di bLf, in un modello murino di fibrosi cistica (CF) dell'infezione polmonare cronica da *Pseudomonas aeruginosa* [65]. Per indurre infezione polmonare acuta o cronica, i topi CF erano infetti intra-tracheali con MDR-RP73 *P. aeruginosa* multiresistente, liberi o incorporati in microsferi di agar. I trattamenti con aerosol bLf o soluzione salina sono stati eseguiti cinque minuti dopo l'infezione ed eseguiti giornalmente per sei giorni. Nei topi CF infetti, la bLf aerosol è risultata efficace nel ridurre significativamente sia il numero di *P. aeruginosa* polmonare sia i leucociti infiltrati. Per la prima volta, i nostri risultati dimostrano che bLf ha anche ridotto l'eccesso di ferro polmonare, nei topi WT e CF. In particolare, l'espressione di Fpn e Ftn è stata significativamente ridotta. Nel complesso, la multifunzionalità di bLf consente di bloccare l'infiammazione e lo squilibrio di ferro indotti da *P. aeruginosa*, riducendo così la gravità dell'infezione correlata alla CF [65]. Un effetto recentemente studiato di Lf è di regolare l'attivazione del plasminogeno, che aggiunge ancora un valore di questa molecola nel controllo della cascata della coagulazione promossa dal virus. LF può esercitare effetti regolatori negativi sulla migrazione cellulare inibendo l'attivazione del Plg e regolando la fibrinolisi [85]. Questa attività è stata anche confermata dall'evidenza di

un peptide con la sequenza di aminoacidi derivata dalla lattoferrina che ha mostrato attività antitrombotica [86]. Più di 140 studi sono disponibili su trial.gov. Tra questi, è stato dimostrato un importante contributo della lattoferrina su anemia, infezione batterica e virale, sia comunitaria che nosocomiale, infiammazione e prevenzione della sepsi. (Tabella 1). Questi studi hanno valutato la sicurezza, la tollerabilità, l'efficacia di Lf sia come integratore alimentare orale sia come spray intranasale. Abbiamo effettuato una ricerca completa sul registro delle prove in corso del National Institutes of Health degli Stati Uniti, usando la parola "lattoferrina". Il primo risultato ha incluso 142 prove. Quindi, abbiamo incluso solo "prove completate", che ha dato 73. Tra queste 73 prove, abbiamo selezionato otto prove con risultati. Al fine di includere risultati non disponibili sul registro delle prove in corso del National Institutes of Health degli Stati Uniti, abbiamo effettuato una ricerca incrociata su PubMed utilizzando il numero NTC. Questo ci ha permesso di includere altri 13 studi completati con risultati. Tra questi 21 studi, otto sono stati esclusi in quanto non pertinenti alla nostra recensione, analizzando altri farmaci. Complessivamente, 13 prove completate con risultati sono inclusi nella tabella. Tutti gli studi sull'uomo sono stati inclusi senza limiti di età, sesso, etnia o tipo di studio. Prove senza risultati sono state escluse. Le analisi hanno anche escluso gli studi sugli animali. (Figura 1).

Fig.1

Nel loro insieme, tutte queste proprietà aprono la strada a considerare Lf come uno strumento promettente in grado di indirizzare gli aspetti multi-faccia della progressione virale e della patogenesi in COVID-19. Storicamente, il trattamento di molte malattie polmonari comportava la consegna sistemica del farmaco; tuttavia, questa modalità è stata generalmente sostituita dall'inalazione, che è più efficace, a

causa del targeting del farmaco sul sito della malattia, e più sicuro, riducendo gli effetti collaterali [87,88]. In sinergia, il successo di nuovi sistemi di somministrazione di farmaci dipende dallo sviluppo di formulazioni in grado di migliorare l'indice terapeutico di molecole biologicamente attive aumentando la loro concentrazione specificamente nei siti o organi target desiderati. Per il miglior effetto terapeutico, è necessario trovare la migliore formulazione farmacologica, sia per bloccare il virus nel microambiente extracellulare delle mucose, sia per stimolare l'immunità locale al fine di promuovere una migliore eliminazione della carica virale, considerando la necessità di agire a livello delle vie aeree superiori e inferiori. È necessaria una formulazione con caratteristiche chimico-fisiche diverse. Tra i particolari metodi di somministrazione dei farmaci usati per trattare le malattie polmonari, sono state proposte strutture simili a membrane composte da trigliceridi e fosfolipidi. La logica dell'uso di questo metodo di somministrazione di farmaci si basa sulla minore tossicità e sulla maggiore compatibilità biologica con l'epitelio polmonare. In alternativa, un'altra formulazione contenente liposomi potrebbe essere preparata con lipidi endogeni, che sono più facilmente assorbiti dalle mucose respiratorie se somministrati per via intra-nasale [89]. La loro composizione può essere regolata per modulare il rilascio di farmaci e potrebbero incapsulare composti sia idrofili che lipofili con elevato carico di farmaci [90]. È noto che l'epitelio mucociliare non offriva una buona superficie per la consegna del farmaco. A questo livello, i liposomi potrebbero ridurre la clearance del farmaco, migliorandone l'assorbimento [91,92,93]. L'RNA virale COVID-19 è stato rilevato nelle vie aeree superiori da pazienti sintomatici, con cariche virali più elevate osservate nei tamponi nasali rispetto a quelle ottenute dalla gola. Cariche virali simili sono state osservate in pazienti asintomatici [41], indicando che l'epitelio nasale è un portale importante per l'infezione iniziale e può fungere da serbatoio chiave per la diffusione virale attraverso la mucosa respiratoria e un importante locus che media la trasmissione virale. L'analisi approfondita delle cellule epiteliali dell'albero respiratorio ha rivelato che le cellule epiteliali nasali, in particolare le cellule caliciformi / secretorie e le cellule ciliate, mostrano la massima espressione ACE2 di tutte le cellule epiteliali analizzate [94]. L'espressione distorta dei recettori virali / proteine associate all'ingresso verso le vie aeree superiori può essere correlata con una maggiore trasmissività. Infine, molti dei principali geni associati all'espressione epiteliale delle vie aeree ACE-2 sono geni antivirali innati immuno-associati, altamente arricchiti nelle cellule epiteliali nasali. Questa associazione con le vie immunitarie potrebbe avere implicazioni cliniche per il decorso dell'infezione e della patologia virale e mette in evidenza il significato specifico degli epitelii nasali nell'infezione virale [94].

Nel loro insieme, riteniamo che tutte queste proprietà giustifichino la progettazione di uno studio clinico per valutare e verificare se un trattamento locale della mucosa nasale con Lf solubilizzato in una formulazione spray nasale intra e l'assunzione orale di Lf, potrebbe contrastare l'infezione e l'infiammazione del coronavirus. Lf agisce come una barriera naturale della mucosa sia respiratoria che

intestinale o ripristina i disordini del ferro relativi alla colonizzazione virale o modula la risposta immunitaria o regola verso il basso le citochine pro-infiammatorie rilasciate dall'infezione virale, senza alcun rischio di possibili eventi avversi. Inoltre, l'inclusione di Lf nelle strutture di conservazione, come i liposomi, riduce la denaturazione gastrica e intestinale mantenendo la sua integrità e quindi la sua funzionalità biologica [95]. Lf potrebbe essere usato in pazienti asintomatici o lievemente sintomatici per prevenire il peggioramento della SARS-CoV2. Il dosaggio ideale di Lf deve essere diversificato sulla base della gravità dei sintomi. I pazienti asintomatici con COVID-19 devono usare 300 mg, somministrati per via orale, raddoppiando il dosaggio (massimo 1gr) per i pazienti lievemente sintomatici [67]. Sugeriamo di mantenere il trattamento almeno fino a quando il buffer COVID-19 diventa negativo.

Bibliografia

1. Tian, X.; Li, C.; Huang, A.; Xia, S.; Lu, S.; Shi, Z.; Lu, L.; Jiang, S.; Yang, Z.; Wu, Y.; et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 382–385. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* **2020**, *395*, 565–574. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
3. Li, H.; Zhou, Y.; Zhang, M.; Wang, H.; Zhao, Q.; Liu, J. Updated Approaches against SARS-CoV-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, 64. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chen, L.; Zhong, L. Genomics functional analysis and drug screening of SARS-CoV-2. *Genes Dis.* **2020**. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Su, S.; Wong, G.; Shi, W.; Liu, J.; Lai, A.C.; Zhou, J.; Liu, W.; Bi, Y.; Gao, G.F. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 490–502. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cui, J.; Li, F.; Shi, Z. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *17*, 181–192. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Guo, Y.-R.; Cao, Q.-D.; Hong, Z.; Tan, Y.-Y.; Chen, S.; Jin, H.; Tan, K.-S.; Wang, D.Y.; Yan, Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak-an update on the status. *Mil. Med Res.* **2020**, *7*, 1–10. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu. Rev. Virol.* **2016**, *3*, 237–261. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Qi, F.; Qian, S.; Zhang, S.; Zhang, Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *526*, 135–140. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Wang, H.-M.; Wu, C.; Jiang, Y.-Y.; Wang, W.-M.; Jin, H. Retinol and vitamin A metabolites accumulate through RBP4 and STRA6 changes in a psoriasis murine model. *Nutr. Metab.* **2020**, *17*, 5–15. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, *181*, 271–280.e8. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
12. Carnevale, S.; Beretta, P.; Morbini, P. Direct endothelial damage and vasculitis due to SARS-CoV-2 in small bowel submucosa of COVID-19 patient with diarrhea. *J. Med Virol.* **2020**.

[[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Agarwal, A.; Chen, A.; Ravindran, N.; To, C.; Thuluvath, P.J. Gastrointestinal and Liver Manifestations of COVID-19. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **2020**, *10*, 263–265. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

14. Burgueño, J.F.; Reich, A.; Hazime, H.; A Quintero, M.; Fernandez, I.; Fritsch, J.; Santander, A.M.; Brito, N.; Damas, O.M.; Deshpande, A.; et al. Expression of SARS-CoV-2 Entry Molecules ACE2 and TMPRSS2 in the Gut of Patients With IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* **2020**, *26*, 797–808. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

15. Chen, Y.; Guo, Y.; Pan, Y.; Zhao, Z.J. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *525*, 135–140. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Liang, W.; Feng, Z.; Rao, S.; Xiao, C.; Xue, X.; Lin, Z.; Zhang, Q.; Qi, W. Diarrhoea may be underestimated: A missing link in 2019 novel coronavirus. *Gut* **2020**, *69*, 1141–1143. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Ong, J.; Young, B.E.; Ong, S. COVID-19 in gastroenterology: A clinical perspective. *Gut* **2020**, *69*, 1144–1145. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

18. Zhang, H.; Li, H.-B.; Lyu, J.-R.; Lei, X.-M.; Li, W.; Wu, G.; Lyu, J.; Dai, Z.-M. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int. J. Infect. Dis.* **2020**, *96*, 19–24. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

19. Wu, Y.; Guo, C.; Tang, L.; Hong, Z.; Zhou, J.; Dong, X.; Yin, H.; Xiao, Q.; Tang, Y.; Qu, X.; et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 434–435. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

20. Dhar, D.; Mohanty, A. Gut microbiota and Covid-19- possible link and implications. *Virus Res.* **2020**, *285*, 198018. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

21. Dumas, A.; Bernard, L.; Poquet, Y.; Lugo-Villarino, G.; Neyrolles, O. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell. Microbiol.* **2018**, *20*, e12966. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Dickson, R.P. The microbiome and critical illness. *Lancet Respir. Med.* **2016**, *4*, 59–72. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

23. Andrews, N. Disorders of Iron Metabolism. *New Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 1293–1294. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Bullen, J.J.; Rogers, H.J.; Griffiths, E. Role of Iron in Bacterial Infection. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **1978**, *80*, 1–35. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

25. Rosa, L.; Cutone, A.; Lepanto, M.S.; Paesano, R.; Valenti, P. Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1985. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

26. Weinberg, E. Iron withholding: A defense against viral infections. *BioMetals* **1996**, *9*, 393–399. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

27. Ganz, T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 1721–1741. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

28. Armitage, A.E.; Stacey, A.R.; Giannoulatou, E.; Marshall, E.; Sturges, P.; Chatha, K.; Smith, N.M.G.; Huang, X.; Xu, X.; Pasricha, S.-R.; et al. Distinct patterns of hepcidin and iron regulation during HIV-1, HBV, and HCV infections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 12187–12192. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

29. Schmidt, S.M. The role of iron in viral infections. *Front. Biosci.* **2020**, *25*, 893–911. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

30. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, *395*, 497–506. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

31. Shankar, A.H.; Prasad, A.S. Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 447S–463S. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Adams-Chapman, I.; Stoll, B.J. Systemic inflammatory response syndrome. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **2001**, *12*, 5–16. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

33. Cutone, A.; Frioni, A.; Berlutti, F.; Valenti, P.; Musci, G.; Di Patti, M.C.B. Lactoferrin prevents LPS-induced decrease of the iron exporter ferroportin in human monocytes/macrophages. *BioMetals* **2014**, *27*, 807–813. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
34. Dall'Agnola, A.; Tome, D.; Kaufman, D.A.; Tavella, E.; Pieretto, M.; Messina, A.; De Luca, D.; Bellaïche, M.; Mosca, A.; Piloquet, H.; et al. Role of Lactoferrin in Neonates and Infants: An Update. *Am. J. Perinatol.* **2018**, *35*, 561–565. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
35. Conti, P.; Ronconi, G.; Caraffa, A.; Gallenga, C.; Ross, R.; Frydas, I.; Kritas, S. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): Anti-inflammatory strategies. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2020**, *34*, 1. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Lagunas-Rangel, F.A.; Chávez-Valencia, V. High IL-6/IFN- γ ratio could be associated with severe disease in COVID-19 patients. *J. Med. Virol.* **2020**. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
37. Han, C.; Duan, C.; Zhang, S.; Spiegel, B.; Shi, H.; Wang, W.; Zhang, L.; Lin, R.; Liu, J.; Ding, Z.; et al. Digestive Symptoms in COVID-19 Patients With Mild Disease Severity. *Am. J. Gastroenterol.* **2020**, *115*, 916–923. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Xiong, T.-Y.; Redwood, S.; Prendergast, B.D.; Chen, M. Coronaviruses and the cardiovascular system: Acute and long-term implications. *Eur. Hear. J.* **2020**, *41*, 1798–1800. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. Li, H.; Liu, L.; Zhang, D.; Xu, J.; Dai, H.; Tang, N.; Su, X.; Cao, B. SARS-CoV-2 and viral sepsis: Observations and hypotheses. *Lancet* **2020**, *395*, 1517–1520. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
40. Zhang, H.; Shang, W.; Liu, Q.; Zhang, X.; Zheng, M.; Yue, M. Clinical characteristics of 194 cases of COVID-19 in Huanggang and Taian, China. *Infection* **2020**. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **2020**, *579*, 270–273. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. 关于印发新冠肺炎康复者恢复期血浆临床治疗方案（试行第二版）的通知. Available online: <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7658/202003/61d608a7e8bf49fca418a6074c2bf5a2.shtml> (accessed on 17 June 2020).
43. Pang, J.; Wang, M.X.; Ang, I.Y.H.; Tan, S.H.X.; Lewis, R.F.; Chen, J.I.-P.; A Gutierrez, R.; Gwee, S.X.W.; Chua, P.E.Y.; Yang, Q.; et al. Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 623. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ahmed, S.F.; Quadeer, A.A.; McKay, M.R. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. *Viruses* **2020**, *12*, 254. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
45. Martinez, M.A. Compounds with Therapeutic Potential against Novel Respiratory 2019 Coronavirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, 64. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Walls, A.C.; Park, Y.-J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Velesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **2020**, *181*, 281–292.e6. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K.; Goldsmith, J.A.; Hsieh, C.-L.; Abiona, O.; Graham, B.S.; McLellan, J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* **2020**, *367*, 1260–1263. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. Li, W.; Moore, M.J.; Vasilieva, N.; Sui, J.; Wong, S.K.; Berne, M.A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J.L.; Luzuriaga, K.; Greenough, T.C.; et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **2003**, *426*, 450–454. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Glowacka, I.; Bertram, S.; Müller, M.A.; Allen, P.; Soilleux, E.; Pfefferle, S.; Steffen, I.; Tsegaye, T.S.; He, Y.; Gnirss, K.; et al. Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *J. Virol.* **2011**, *85*, 4122–4134. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

50. Wang, X.; Xu, W.; Hu, G.; Xia, S.; Sun, Z.; Liu, Z.; Xie, Y.; Zhang, R.; Jiang, S.; Lu, L. SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fusion. *Cell. Mol. Immunol.* **2020**, 1–3. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Shimazaki, Y.; Takahashi, A. Antibacterial activity of lysozyme-binding proteins from chicken egg white. *J. Microbiol. Methods* **2018**, *154*, 19–24. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
52. Mancinelli, R.; Rosa, L.; Cutone, A.; Lepanto, M.S.; Franchitto, A.; Onori, P.; Gaudio, E.; Valenti, P. Viral Hepatitis and Iron Dysregulation: Molecular Pathways and the Role of Lactoferrin. *Mol.* **2020**, *25*, 1997. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Chang, R.; Zen Sun, W.; Bun Ng, T. Lactoferrin as potential preventative and treatment for COVID-19. *Authorea* **2020**. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
54. Masson, P.L.; Heremans, J.F.; Schonke, E. Lactoferrin, An Iron-Binding Protein in Neutrophilic Leukocytes. *J. Exp. Med.* **1969**, *130*, 643–658. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Actor, J.K.; Hwang, S.-A.; Kruzel, M.L. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 1956–1973. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
56. Wang, C.-S.; Chan, W.-Y.; Kloer, H.U. Comparative studies on the chemical and immunochemical properties of human milk, human pancreatic juice and bovine milk lactoferrin. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1984**, *78*, 575–580. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
57. Valenti, P.; Antonini, G. Lactoferrin. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2576–2587. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
58. Kruzel, M.L.; Zimecki, M.; Actor, J.K. Lactoferrin in a Context of Inflammation-Induced Pathology. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 8. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
59. Ashida, K.; Sasaki, H.; Suzuki, Y.A.; Lönnnerdal, B. Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *BioMetals* **2004**, *17*, 311–315. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
60. Suzuki, Y.A.; Wong, H.; Ashida, K.-Y.; Schryvers, A.B.; Lönnnerdal, B. The N1 Domain of Human Lactoferrin Is Required for Internalization by Caco-2 Cells and Targeting to the Nucleus†. *Biochemistry* **2008**, *47*, 10915–10920. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
61. Liao, Y.; Jiang, R.; Lönnnerdal, B. Biochemical and molecular impacts of lactoferrin on small intestinal growth and development during early life† This article is part of a Special Issue entitled Lactoferrin and has undergone the Journal’s usual peer review process. *Biochem. Cell Biol.* **2012**, *90*, 476–484. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
62. Frioni, A.; Conte, M.P.; Cutone, A.; Longhi, C.; Musci, G.; Di Patti, M.C.B.; Natalizi, T.; Marazzato, M.; Lepanto, M.S.; Puddu, P.; et al. Lactoferrin differently modulates the inflammatory response in epithelial models mimicking human inflammatory and infectious diseases. *BioMetals* **2014**, *27*, 843–856. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Cutone, A.; Rosa, L.; Lepanto, M.S.; Scotti, M.J.; Berlutti, F.; Di Patti, M.C.B.; Musci, G.; Valenti, P. Lactoferrin Efficiently Counteracts the Inflammation-Induced Changes of the Iron Homeostasis System in Macrophages. *Front. Immunol.* **2017**, *8*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Valenti, P.; Frioni, A.; Rossi, A.; Ranucci, S.; De Fino, I.; Cutone, A.; Rosa, L.; Bragonzi, A.; Berlutti, F. Aerosolized bovine lactoferrin reduces neutrophils and pro-inflammatory cytokines in mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Biochem. Cell Biol.* **2017**, *95*, 41–47. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Cutone, A.; Lepanto, M.S.; Rosa, L.; Scotti, M.J.; Rossi, A.; Ranucci, S.; De Fino, I.; Bragonzi, A.; Valenti, P.; Musci, G.; et al. Aerosolized Bovine Lactoferrin Counteracts Infection, Inflammation and Iron Dysbalance in A Cystic Fibrosis Mouse Model of *Pseudomonas aeruginosa* Chronic Lung Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2128. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Paesano, R.; Pacifici, E.; Benedetti, S.; Berlutti, F.; Frioni, A.; Polimeni, A.; Valenti, P. Safety and efficacy of lactoferrin versus ferrous sulphate in curing iron deficiency and iron deficiency anaemia in hereditary thrombophilia pregnant women: An interventional study. *BioMetals* **2014**, *27*, 999–1006. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
67. Lepanto, M.S.; Rosa, L.; Cutone, A.; Conte, M.P.; Paesano, R.; Valenti, P. Efficacy of

- Lactoferrin Oral Administration in the Treatment of Anemia and Anemia of Inflammation in Pregnant and Non-pregnant Women: An Interventional Study. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2123. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
68. Berlutti, F.; Pantanella, F.; Natalizi, T.; Frioni, A.; Paesano, R.; Polimeni, A.; Valenti, P. Antiviral Properties of Lactoferrin—A Natural Immunity Molecule. *Mol.* **2011**, *16*, 6992–7018. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
69. Wakabayashi, H.; Oda, H.; Yamauchi, K.; Abe, F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. *J. Infect. Chemother.* **2014**, *20*, 666–671. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
70. Marchetti, M.; Pisani, S.; Antonini, G.; Valenti, P.; Seganti, L.; Orsi, N. Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit in vitro replication of herpes simplex virus type 1 and 2. *BioMetals* **1998**, *11*, 89–94. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
71. Marchetti, M.; Superti, F.; Ammendolia, M.G.; Rossi, P.; Valenti, P.; Seganti, L. Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese- and zinc-saturated lactoferrin. *Med Microbiol. Immunol.* **1999**, *187*, 199–204. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
72. Siciliano, R.; Rega, B.; Marchetti, M.; Seganti, L.; Antonini, G.; Valenti, P.; Siciliano, R.A. Bovine Lactoferrin Peptidic Fragments Involved in Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *264*, 19–23. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Superti, F.; Siciliano, R.A.; Rega, B.; Giansanti, F.; Valenti, P.; Antonini, G. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.* **2001**, *1528*, 107–115. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
74. Marchetti, M.; Longhi, C.; Conte, M.P.; Pisani, S.; Valenti, P.; Seganti, L. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells. *Antivir. Res.* **1996**, *29*, 221–231. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
75. El Yazidi-Belkoura, I.; Legrand, D.; Nuijens, J.; Slomianny, M.-C.; Van Berkel, P.; Spik, G. The binding of lactoferrin to glycosaminoglycans on enterocyte-like HT29-18-C1 cells is mediated through basic residues located in the N-terminus. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergy* **2001**, *1568*, 197–204. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
76. Groot, F.; Geijtenbeek, T.B.H.; Sanders, R.W.; Baldwin, C.E.; Sanchez-Hernandez, M.; Floris, R.; Van Kooyk, Y.; De Jong, E.C.; Berkhout, B. Lactoferrin Prevents Dendritic Cell-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission by Blocking the DC-SIGN—gp120 Interaction. *J. Virol.* **2005**, *79*, 3009–3015. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
77. Chien, Y.-J.; Chen, W.-J.; Hsu, W.; Chiou, S.-S. Bovine lactoferrin inhibits Japanese encephalitis virus by binding to heparan sulfate and receptor for low density lipoprotein. *Virology* **2008**, *379*, 143–151. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
78. Superti, F.; Ammendolia, M.G.; Valenti, P.; Seganti, L. Antirotaviral activity of milk proteins: Lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med Microbiol. Immunol.* **1997**, *186*, 83–91. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
79. Puddu, P.; Borghi, P.; Gessani, S.; Valenti, P.; Belardelli, F.; Seganti, L. Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Int. J. Biochem. Cell Boil.* **1998**, *30*, 1055–1063. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
80. Yi, M.; Kaneko, S.; Yu, D.Y.; Murakami, S. Hepatitis C virus envelope proteins bind lactoferrin. *J. Virol.* **1997**, *71*, 5997–6002. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
81. Sano, H.; Nagai, K.; Tsutsumi, H.; Kuroki, Y. Lactoferrin and surfactant protein A exhibit distinct binding specificity to F protein and differently modulate respiratory syncytial virus infection. *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33*, 2894–2902. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
82. Tinari, A.; Pietrantonio, A.; Ammendolia, M.G.; Valenti, P.; Superti, F. Inhibitory activity of bovine lactoferrin against echovirus induced programmed cell death in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *25*, 433–438. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Lang, J.; Yang, N.; Deng, J.; Liu, K.; Yang, P.; Zhang, G.; Jiang, C. Inhibition of SARS Pseudovirus Cell Entry by Lactoferrin Binding to Heparan Sulfate Proteoglycans. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23710. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Burckhardt, C.J.; Greber, U.F. Virus Movements on the Plasma Membrane Support Infection

- and Transmission between Cells. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000621. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
85. Zwirzitz, A.; Reiter, M.; Skrabana, R.; Ohradanova-Repic, A.; Majdic, O.; Gutekova, M.; Cehlar, O.; Petrovčiková, E.; Kutejová, E.; Stanek, U.-P.D.G.; et al. Lactoferrin is a natural inhibitor of plasminogen activation. *J. Boil. Chem.* **2018**, *293*, 8600–8613. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Xu, S.; Fan, F.; Liu, H.; Cheng, S.; Tu, M.; Du, M. Novel Anticoagulant Peptide from Lactoferrin Binding Thrombin at the Active Site and Exosite-I. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 3132–3139. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
87. Cipolla, D.; Gonda, I. Formulation technology to repurpose drugs for inhalation delivery. *Drug Discov. Today Ther. Strat.* **2011**, *8*, 123–130. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
88. Toogood, J.; Markov, A.; Baskerville, J.; Dyson, C. Association of ocular cataracts with inhaled and oral steroid therapy during long-term treatment of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1993**, *91*, 571–579. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
89. Cipolla, D.; Wu, H.; Gonda, I.; Chan, H.-K. Aerosol Performance and Stability of Liposomes Containing Ciprofloxacin Nanocrystals. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2015**, *28*, 411–422. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
90. Loira-Pastoriza, C.; Todoroff, J.; Vanbever, R. Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *75*, 81–91. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
91. Sahu, P.K.; Mishra, D.K.; Jain, N.; Rajoriya, V.; Jain, A.K. Mannosylated solid lipid nanoparticles for lung-targeted delivery of Paclitaxel. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2014**, *41*, 640–649. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
92. Baek, J.-S.; Cho, C.-W. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-modified SLN of paclitaxel for overcoming p-glycoprotein function in multidrug-resistant breast cancer cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *65*, 72–78. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Makino, K.; Nakajima, T.; Shikamura, M.; Ito, F.; Ando, S.; Kochi, C.; Inagawa, H.; Soma, G.-I.; Terada, H. Efficient intracellular delivery of rifampicin to alveolar macrophages using rifampicin-loaded PLGA microspheres: Effects of molecular weight and composition of PLGA on release of rifampicin. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2004**, *36*, 35–42. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Sungnak, W.; Network, H.L.B.; Huang, N.; Bécavin, C.; Berg, M.; Queen, R.; Litvinukova, M.; Talavera-López, C.; Maatz, H.; Reichart, D.; et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 681–687. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Liu, W.; Ye, A.; Liu, W.; Liu, C.; Singh, H. Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared from milk fat globule membrane-derived phospholipids. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 2061–2070. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]