

LAVORO DI MATURITÀ IN  
BIOLOGIA E CHIMICA  
LICEO CANTONALE DI LOCARNO  
2021

AMÉLIE PERRIARD

---

**INFLUSSO DELLE VARIANTI POLIMORFICHE  
DEL GENE *HSD3B1* SUL DECORSO  
DELL'INFEZIONE DA SARS-COV-2**

---

## Indice

Abstract.....	2
1. Introduzione.....	3
1.1. La pandemia di COVID-19 .....	3
1.2. Meccanismo di infezione da SARS-CoV-2.....	6
1.3. Il polimorfismo dell' <i>HSD3B1</i> .....	9
1.3.1. Generalità sui polimorfismi .....	9
1.3.2. Il gene <i>HSD3B1</i> .....	9
1.3.3. Il recettore androgenico.....	14
2. Scopo.....	16
3. Pazienti e metodi.....	16
3.1. Procedimenti .....	17
3.1.1. Estrazione del DNA.....	17
3.1.2. Reazione a catena della polimerasi .....	19
3.1.3. Verifica dell'amplificato su gel di agarosio .....	20
3.1.4. Purificazione post PCR.....	22
3.1.5. Cycle Sequencing.....	22
3.1.6. Purificazione post cycle sequencing .....	23
3.1.7. Sequenziamento tramite elettroforesi capillare.....	23
3.1.8. Criteri di valutazione .....	24
3.1.9. Analisi Statistiche.....	25
4. Risultati .....	26
4.1. Caratteristiche della casistica .....	26
4.2. Analisi bivariate.....	27
4.3. Test di Spearman e Pearson .....	28
4.4. Correlazioni tra le variabili rispetto all'ammissione in cure intense .....	28
4.5. Correlazioni tra le variabili rispetto al decesso .....	30
5. Discussione.....	31
6. Conclusione .....	35
7. Ringraziamenti .....	35
8. Bibliografia .....	36

## Abstract

Il virus SARS-CoV-2 utilizza la via dei recettori androgenici, attraverso il recettore ACE2 e TMPRSS2, per infettare le cellule epiteliali della mucosa respiratoria delle vie aeree superiori e inferiori. Il principale ligando del recettore androgenico è il diidrotestosterone, la cui sintesi è regolata dal gene *HSD3B1*. Questo gene, a livello germinale, è caratterizzato da un polimorfismo.

Studi genetici hanno dimostrato che, rispetto alla variante P1245A, la variante P1245C del gene *HSD3B1*, in particolare se in omozigosi, aumenta la produzione di diidrotestosterone con conseguente aumento dell'espressione di TMPRSS2.

Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare il polimorfismo del gene *HSD3B1* e la sua potenziale associazione con il decorso della malattia COVID-19.

Per questa ricerca è stato caratterizzato il genotipo di 400 pazienti ammalati di COVID-19 e ospedalizzati all'Ente Ospedaliero Cantonale e alla Clinica Moncucco durante la prima ondata pandemica in Ticino (febbraio-maggio 2020).

Le varianti polimorfiche sono state caratterizzate attraverso il sequenziamento diretto, partendo dall'estrazione del DNA genomico da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Le diverse associazioni statistiche sono state analizzate applicando differenti test e modelli.

In generale, le varianti polimorfiche del gene *HSD3B1* non sono state associate a nessun singolo fattore correlato ad un decorso sfavorevole nei pazienti affetti da SARS-CoV-2. Tuttavia, in specifici sottogruppi, sono state trovate delle associazioni statisticamente significative inerenti alle varianti del gene *HSD3B1*. In particolare, i pazienti P1245C diabetici sono risultati essere maggiormente predisposti a necessitare delle cure intensive rispetto ai pazienti P1245A non affetti da tale comorbidità. Per quanto concerne il decesso, quest'ultimo è risultato essere maggiormente associato alle persone P1245A>C ipertese rispetto ai pazienti P1245A non ipertesi. Infine, l'aumento del rischio di decesso con l'avanzare dell'età è stato associato maggiormente ai pazienti P1245C.

I risultati ottenuti con questo studio sono i primi a dimostrare una possibile associazione tra le varianti polimorfiche del gene *HSD3B1* e la gravità dell'infezione da SARS-CoV-2. Se confermati, tali analisi potrebbero essere utilizzate per prevedere lo stato clinico dei pazienti affetti da questo virus.

## 1. Introduzione

### 1.1. La pandemia di COVID-19

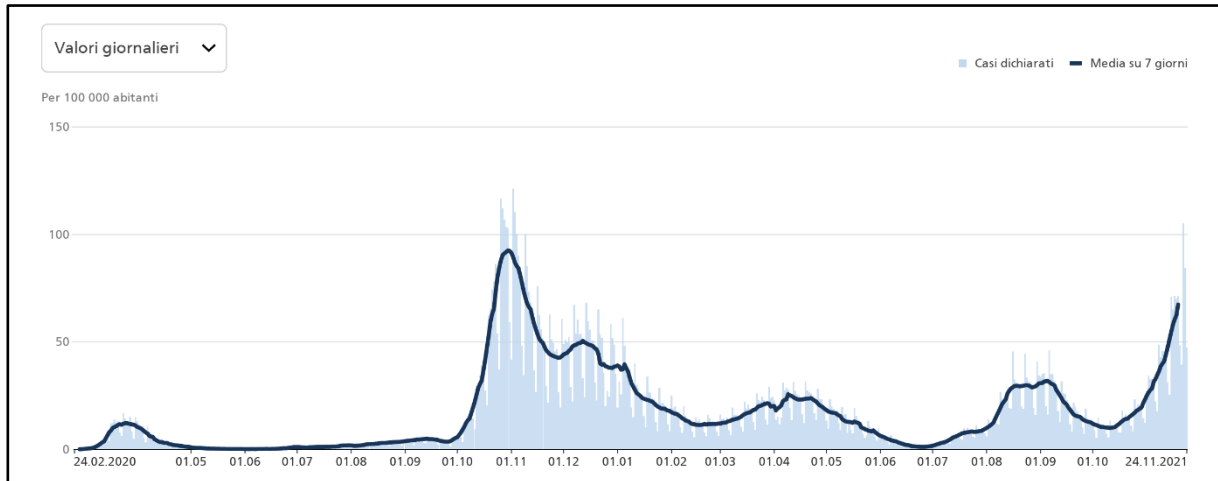
La Commissione Sanitaria Municipale di Wuhan, metropoli cinese nella provincia di Hubei, ha segnalato a dicembre 2019 un grande numero di casi di polmonite atipica di origine sconosciuta. A gennaio 2020 il Centro cinese per la prevenzione e il controllo delle malattie ha annunciato l'identificazione di una nuova variante di coronavirus, chiamato Coronavirus 2 da sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2), come causa della malattia ora conosciuta come COVID-19.

L'origine del virus non è accertata, tuttavia la teoria più verosimile coinvolge il mercato di animali vivi di Huanan, luogo familiare alla maggior parte dei primi pazienti ricoverati a Wuhan. Il mercato è stato chiuso a inizio gennaio 2020 e materiale biologico da esso prelevato è stato analizzato in laboratorio, dove si è accertata un'affinità del 96,2% tra SARS-CoV-2 e un coronavirus dei pipistrelli, che potrebbero dunque rappresentare l'inizio della catena di contagio (Ludwig & Zarbock, 2020). Resta incerto se il virus sia stato diffuso direttamente all'uomo dai pipistrelli, ospiti di numerosi tipi di coronavirus, o se altri animali abbiano agito da intermediari; tra questi, i principali sospetti ricadono sui serpenti e i pangolini (Zhang & Holmes, 2020).

Soprattutto a seguito dell'enorme affluenza turistica in Cina per il Nuovo Anno Cinese il virus si è rapidamente diffuso in tutto il mondo, portando l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organisation, WHO) a dichiarare l'11 marzo 2020 lo stato di pandemia (Singhal, 2020).

In Europa la pandemia ha colpito inizialmente e con forte impeto l'Italia; per tale motivo, in Svizzera la zona maggiormente affetta dalla prima ondata pandemica è stata il Cantone Ticino. Guardando i dati fino a novembre 2021, il Ticino è anche il cantone svizzero con il maggior numero di deceduti in rapporto alla sua popolazione (UFSP, aggiornato al 24.11.2021).

Fino ad oggi in Svizzera ci sono state principalmente quattro ondate; due nel 2020 (una ad inizio primavera e la seconda in autunno) e due nel 2021 (primavera e autunno); una nuova ondata è incominciata inoltre a novembre 2021 (Figura 1).



**Figura 1: Andamento della pandemia in Svizzera e nel Liechtenstein.** Si osservano le 4 ondate situate durante la primavera 2020, verso la fine dell'anno 2020, durante la primavera e durante l'autunno 2021, oltre all'insorgere di una nuova ondata a novembre 2021. Il numero di infezioni rilevate più alto è stato registrato durante la seconda ondata. Tratto da: Ufficio Federale della Sanità Pubblica. Stato al: 25.11.2021, ore 07:51.

In data 24 novembre 2021, il numero di casi di COVID-19 confermati in laboratorio in Svizzera e Liechtenstein era di 978,794 mentre i decessi erano 11,080 (UFSP, aggiornato al 24.11.2021). Tuttavia tali dati non sono attendibili per calcolare il tasso di mortalità, in quanto si deve ipotizzare un numero presumibilmente molto elevato di infetti non rilevati con un test PCR analizzato in laboratorio o di persone paucisintomatiche o asintomatiche, tutte categorie che sfuggono alle statistiche ufficiali.

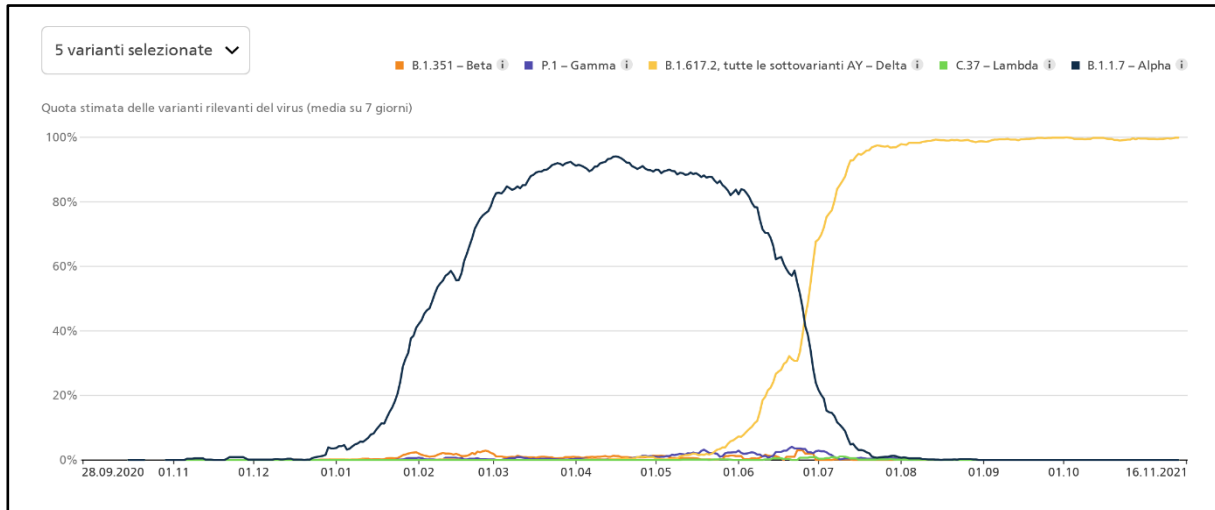
La malattia COVID-19 presenta sintomi affini a quelli influenzali. La maggior parte dei pazienti manifesta febbre, tosse secca, fatica, dolori muscolari, dispnea, e, in minor percentuale, sintomi gastrointestinali. Tali condizioni possono tuttavia peggiorare gravemente e portare a polmonite, a problemi respiratori severi, alla necessità di essere ricoverati in cure intense o addirittura al decesso (Tu et al., 2020).

Persone di ogni età possono essere colpite da COVID-19 e sviluppare sintomi. Tuttavia, pazienti di età più avanzata sono maggiormente a rischio di sviluppare sintomi gravi, mentre tra i più giovani è presente un maggior numero di infetti asintomatici (Hu et al., 2020). È stato inoltre dimostrato un maggiore rischio di decorso severo dell'infezione da SARS-CoV-2 negli uomini rispetto alle donne, nonostante il numero di infetti sia comparabile (Jin et al., 2020). Anche la presenza di comorbidità aumenta il rischio di decorso grave: in particolare, il diabete mellito e l'ipertensione arteriosa sembrerebbero essere dei fattori di rischio significativi (Zhang et al., 2020). Inoltre, la presenza di tumori sembra comportare un rischio più elevato, soprattutto se i pazienti sono sottoposti a chemioterapia, la quale tende generalmente ad indebolire sensibilmente il sistema immunitario (Landman, Feetham & Stuckey, 2020). In generale, ogni comorbidità può peggiorare il decorso dell'infezione in quanto comporta una sovrastimolazione del sistema immunitario; questo indebolimento può anche essere causato

dalle terapie seguite per curare tali patologie. Infine, anche l'indice di massa corporea (Body Mass Index – BMI), calcolato come rapporto tra la massa in chilogrammi e il quadrato dell'altezza in metri di un paziente, è stato dimostrato essere un importante indicatore di predisposizione ad un decorso più grave. Una persona è considerata sottopeso se il valore ottenuto è minore di 18.5 kg/m<sup>2</sup>, di massa normale se è compreso tra 18.5 kg/m<sup>2</sup> e 24.9 kg/m<sup>2</sup>, sovrappeso se ricade nell'intervallo da 25 kg/m<sup>2</sup> a 29.9 kg/m<sup>2</sup> e obesa per tutti i valori superiori. Per l'infezione da SARS-CoV-2, il rischio a decorso grave aumenta linearmente con l'aumento del BMI sopra la soglia di 23 kg/m<sup>2</sup> (Gao et al., 2021).

Numerose ditte farmaceutiche si sono concentrate sullo sviluppo di vaccini contro il SARS-CoV-2. Stando a quanto dichiarato dalla WHO, a dicembre 2020 erano più di 214 i vaccini candidati. Le strategie usate da questi vaccini possono essere suddivise in sette categorie. I vaccini possono contenere virus inattivati o attenuati in laboratorio; l'intera struttura proteica virale privata del genoma, o solo alcune proteine caratteristiche del virus; vettori virali portanti i geni necessari alla produzione da parte delle cellule di antigeni patogeni; oppure informazioni genetiche, sotto forma di DNA o mRNA, dalle quali la cellula produce le proteine virali contro cui attua poi un'immunizzazione (Dai & Gao, 2021). In Svizzera, al momento sono approvati i due vaccini a mRNA delle ditte Moderna e Pfizer-BioNTech e il vaccino a vettore virale della ditta Johnson&Johnson, somministrati gratuitamente a chi si annuncia per la vaccinazione. Per i vaccini a mRNA sono necessarie due dosi, iniettate ad un mese di distanza, per raggiungere l'immunità, la cui durata non è ancora accertata (Swissmedic, aggiornato al 25.11.2021).

Negli ultimi mesi la diffusione di diverse varianti del SARS-CoV-2 ha causato ulteriore preoccupazione, in quanto i vaccini potrebbero rispondere meno adeguatamente a infezioni da parte di esse. A novembre 2021, le più discusse in Europa erano le varianti denominate Alpha, Beta, Gamma, Delta, Lambda e Omicron, le quali sono state rilevate per la prima volta nel Regno Unito, in Sudafrica, in Brasile, in India, in Perù e in Sudafrica rispettivamente. In Europa, e di conseguenza anche in Svizzera, i casi caratterizzati dalla variante Delta stanno aumentando esponenzialmente dall'estate 2021 (Figura 2).



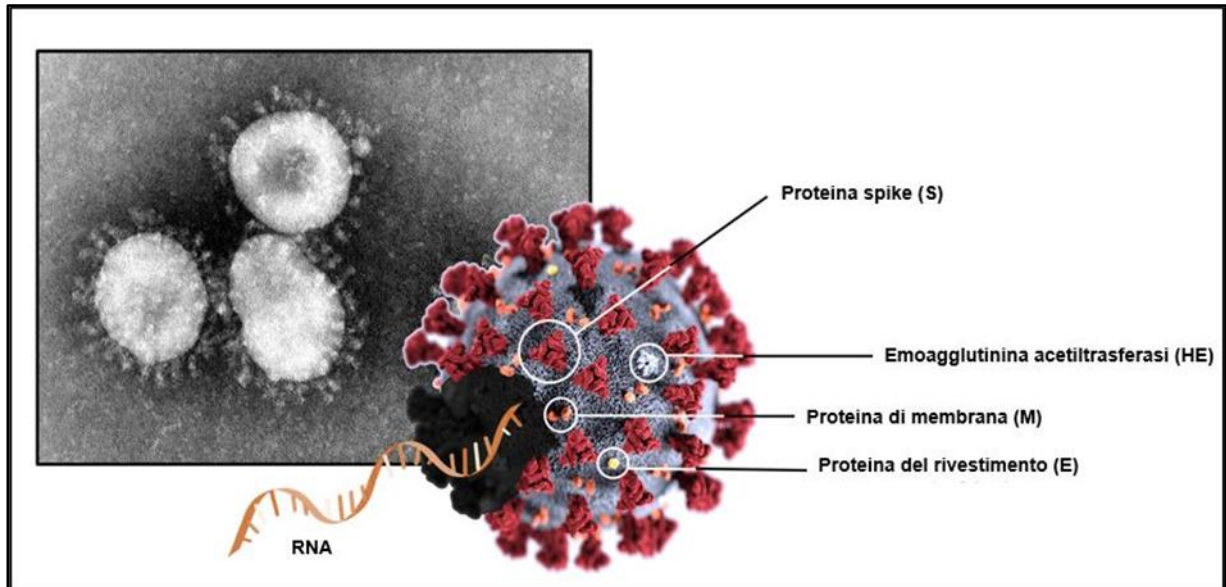
**Figura 2: Diffusione delle varianti di SARS-CoV-2 in Svizzera e nel Liechtenstein.** La variante Delta si sta diffondendo rapidamente, a scapito della variante Alpha che preoccupava precedentemente. Tratto da: Ufficio Federale della Sanità Pubblica. Stato al: 25.11.2021, ore 08:02.

## 1.2. Meccanismo di infezione da SARS-CoV-2

I coronavirus sono un'ampia famiglia di virus che possono causare infezioni in numerose specie, in particolare in uccelli e in mammiferi quali balene e pipistrelli e che possono essere suddivisi in quattro sottogruppi:  $\alpha$ -coronavirus,  $\beta$ -coronavirus,  $\gamma$ -coronavirus e  $\delta$ -coronavirus. Al momento sono stati identificati sette tipi di coronavirus, appartenenti ai generi  $\alpha$ -coronavirus e  $\beta$ -coronavirus, in grado di infettare l'uomo, causando sintomi che possono variare da deboli raffreddori a gravi infezioni del tratto respiratorio. Due di questi virus sono stati responsabili delle epidemie di SARS nel 2003 e di MERS nel 2012. Le analisi genomiche dell'attuale coronavirus SARS-CoV-2, appartenente ai  $\beta$ -coronavirus, hanno rilevato una somiglianza del 79% e del 50% con i precedenti coronavirus che hanno causato le epidemie del 2003 e del 2012, rispettivamente (Hasöksüz, Kiliç & Saraç, 2020).

I coronavirus sono caratterizzati da una forma rotondeggiante ricoperta da glicoproteine che conferiscono la somiglianza con una corona, da cui prendono il nome (Figura 3).

Le glicoproteine, che ricoprono la membrana lipidica che riveste il virus, sono denominate glicoproteine spike. Queste sono raggruppate a gruppi da tre, formando i cosiddetti trimeri di glicoproteine spike. All'interno del virus è racchiuso il suo materiale genetico, costituito da un singolo filamento di RNA positivo, ovvero con orientamento 5'-3'. Il materiale genetico dei coronavirus può essere lungo da 26400 a 31700 basi, il più lungo tra tutti i virus a RNA conosciuti. Ulteriori strutture caratteristiche di SARS-CoV-2 sono alcune proteine di membrana e di rivestimento e la proteina emoagglutinina acetiltrasferasi, essenziali durante l'attacco alla cellula ospite e alla conseguente formazione di nuovi virioni (Ludwig & Zarbock, 2020).



**Figura 3: Fotografia al microscopio elettronico e struttura del  $\beta$ -coronavirus SARS-CoV-2.** Sono indicate le principali strutture del virus responsabile della malattia COVID-19. È fondamentale nel processo di infezione la glicoproteina spike, i quali trimeri conferiscono al virus il caratteristico profilo a corona. Tratto da: Montemiglio et al. *L'infezione alla luce della biologia strutturale*. Zanichelli. 2020.

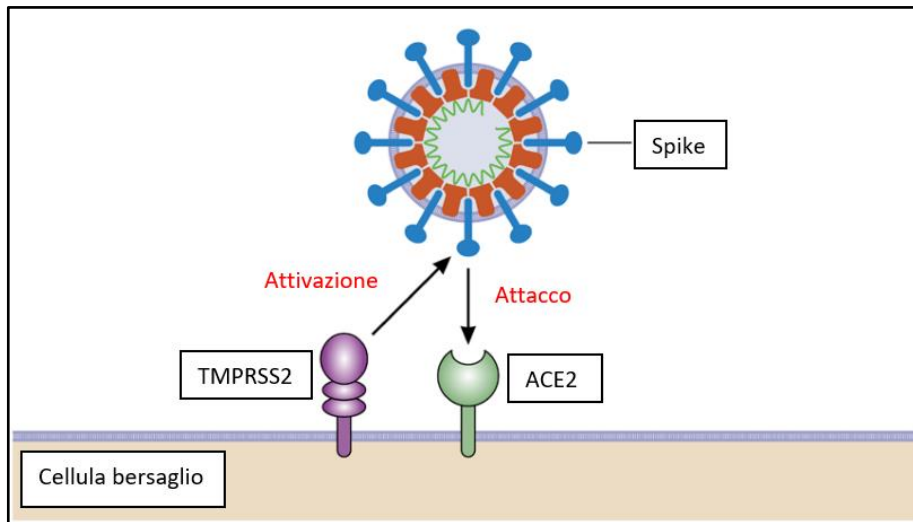
La trasmissione di SARS-CoV-2 avviene tramite goccioline di aerosol, con diametro inferiore a 5  $\mu\text{m}$ , diffuse principalmente per via aerea (starnuti, parlare o semplicemente il respiro). Inoltre, il virus può anche essere trasmesso tramite contatto con una superficie infetta. Possono fungere da vettori sia pazienti sintomatici sia asintomatici (Singhal, 2020). Il virus SARS-CoV-2 entra nell'individuo infettando le mucose; ciò avviene tramite il contatto con la mucosa nasale o degli occhi oppure quando è inalato (Subbarao & Mahanty, 2020).

Le cellule bersaglio di SARS-CoV-2 sono pertanto le cellule epiteliali della mucosa respiratoria, comprese le vie aeree inferiori, ovvero trachea, bronchi e polmoni, e quelle delle vie aeree superiori, cioè cavità nasali e paranasali, faringe e laringe. SARS-CoV-2 entra in esse con il cosiddetto sistema chiave-serratura: la glicoproteina spike del virus, ovvero la chiave, si lega alla serratura, data da una proteina di membrana della cellula, l'enzima convertitore dell'angiotensina 2 (ACE2) (Montemiglio et al., 2020). ACE2 è un enzima implicato nel controllo della pressione sanguigna, ed è utilizzato come serratura per l'entrata nella cellula anche di altri coronavirus, tra cui quello responsabile della precedente epidemia di SARS (2003). Un recente studio ha dimostrato una maggiore espressione di ACE2 negli uomini rispetto alle donne (Asselta et al., 2020). Un altro studio ha trovato inoltre una diminuzione dell'espressione di ACE2 tramite inibizione dell'enzima  $5\alpha$ -reduttasi, coinvolto nella sintesi degli ormoni androgeni, suggerendo una correlazione diretta tra stimolazione del recettore androgenico ed espressione di ACE2 (Baratchian et al., 2020).

Dopo essersi legata all'ACE2, la glicoproteina spike favorisce la fusione tra la membrana cellulare e quella virale, inducendo l'endocitosi del virione da parte della cellula (Figura 4). Ad attivare la proteina spike e contribuire alla proteolisi che porta alla fusione delle membrane è



la serina proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2), una proteina normalmente presente nella membrana cellulare. TMPRSS2 era stata responsabile dello stesso processo anche per il virus SARS-CoV, responsabile della passata epidemia di SARS (2003) (Matsuyama et al., 2010).



**Figura 4: Meccanismo di entrata nella cellula da parte di SARS-CoV-2.** La proteina virale spike è attivata dalla proteina TMPRSS2 e si lega alla proteina ACE2. Tratto da: Clerkin et al. COVID-19 and Cardiovascular Disease. Circulation. 2020. Immagine modificata dall'autrice del Lavoro di Maturità.

Il materiale genetico del virus, essendo un singolo filamento di RNA positivo, funge da RNA messaggero nella cellula, ed è tradotto nelle strutture proteiche necessarie ai nuovi virioni. Il materiale genetico per i virioni proviene dal filamento di RNA negativo, ottenuto a partire da quello positivo virale, e utilizzato a sua volta come stampo per ulteriori filamenti di RNA positivo grazie all'enzima virale RNA polimerasi RNA-dipendente (Marks et al., 2021).

La proteina TMPRSS2, che è quindi essenziale nel meccanismo di infezione della cellula da parte di SARS-CoV-2, è stata a sua volta dimostrata essere dipendente dal recettore androgenico, che ne regola l'espressione agendo da fattore di trascrizione per il gene che la codifica. Dal momento che gli androgeni sono degli ormoni prevalentemente maschili, e dunque il recettore androgenico è maggiormente stimolato negli uomini, nei pazienti di sesso maschile la proteina TMPRSS2 è espressa in quantità più elevata (Ghazidadeh et al., 2020). Per questo motivo, la ricerca riguardo il SARS-CoV-2 si è agganciata allo studio dai recettori di ormoni sessuali e delle differenze tra i sessi nella loro espressione.

### 1.3. Il polimorfismo dell'*HSD3B1*

#### 1.3.1. Generalità sui polimorfismi

Nell'uomo, la replicazione del DNA è eseguita dall'enzima DNA polimerasi III, che replica in pochi secondi i 6 miliardi di basi azotate che costituiscono il doppio filamento di DNA della cellula. Durante il processo di replicazione, la base azotata adenina è appaiata alla timina, la guanina alla citosina, e viceversa. Il margine di errore è basso, anche grazie a sistemi di controllo che individuano e correggono errori di appaiamento, identificabili perché causano una variazione dell'altrimenti regolare calibro del doppio filamento di DNA originatosi. Gli errori sono in tal modo ridotti a 1 ogni 3 miliardi di basi replicate; ciò significa tuttavia che ad ogni replicazione corrispondono in media due errori di appaiamento di basi e dunque due mutazioni. La maggior parte di queste mutazioni genetiche non ha alcun effetto, in quanto situata in una parte di DNA non funzionale alla cellula in questione, oppure perché non causa una modifica significativa nella proteina codificata. Tuttavia, alcune di queste alterazioni causano invece una modifica nella struttura finale con conseguente malfunzionamento della proteina (Kunkel, 2004).

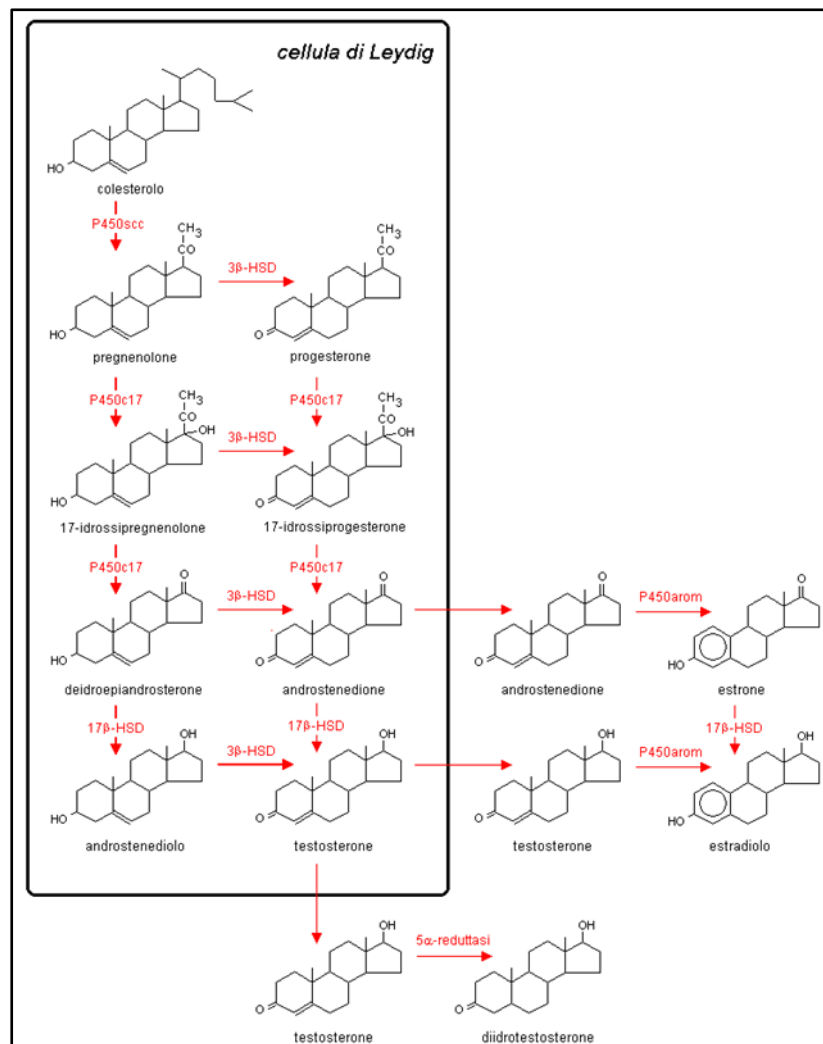
Un polimorfismo a singolo nucleotide è causato da tali eventi, ed è distinto dalle mutazioni puntiformi per la propria frequenza nella popolazione, che deve essere maggiore all'1%. Nella popolazione sono quindi presenti due varianti, dette alleli, dell'informazione genetica in questione. I due alleli sono dovuti all'unione delle informazioni genetiche portate dall'ovulo e dallo spermatozoo; un allele è dunque ereditato dalla madre, e l'altro dal padre. La maggioranza dei polimorfismi presenti in natura non ha alcuna rilevanza clinica accertata. Esistono però esempi di polimorfismi correlati a decorsi specifici per alcune malattie. Se questi decorsi sono correlati a prognosi migliori, il polimorfismo tende ad essere tramandato alle generazioni successive, in quanto offre vantaggi selettivi. Ne è un esempio eclatante l'allele HbS negli individui affetti da anemia falciforme. Questo allele è presente con alta frequenza nelle zone colpite dalla malaria, in quanto ai suoi possessori eterozigoti, sebbene leggermente anemici (in quanto i globuli rossi assumono una forma a mezzaluna che passa più difficoltosamente nei capillari sanguigni), attribuisce resistenza contro l'agente patogeno *Plasmodium falciparum*, responsabile della malattia. Nelle zone ove la malaria non è endemica, questo allele comporta invece uno svantaggio selettivo ed è quindi anche meno diffuso (Kreuels et al., 2010). Questo esempio mostra come un singolo polimorfismo possa avere diversi effetti, sia vantaggiosi sia svantaggiosi, e può avere influsso su condizioni cliniche diverse.

#### 1.3.2. Il gene *HSD3B1*

Il gene *HSD3B1* è localizzato sul cromosoma 1 ed è responsabile della codifica dell'enzima 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi 1 (3 $\beta$ -HSD1).

A differenza dell'enzima  $3\beta$ -HSD2, codificato dal gene *HSD3B2* e coinvolto nella sintesi di testosterone nelle gonadi, l'enzima  $3\beta$ -HSD1 è presente nei tessuti periferici (tessuto mammario, placenta, pelle e prostata) ed è responsabile della conversione degli androgeni in testosterone, ormone steroide presente in entrambi i sessi, ma maggiormente negli uomini (Figura 5). Sebbene i due enzimi  $3\beta$ -HSD1 e  $3\beta$ -HSD2 siano molto simili strutturalmente, la loro specificità a tessuti e processi diversi è dimostrata in parte dall'assenza di influsso del genotipo dell'*HSD3B1* per la manifestazione di eventuali mutazioni nel gene *HSD3B2* (Sabharwal & Sharifi, 2019).

Nella prostata, l'enzima  $3\beta$ -HSD1 è indispensabile per la prima fase del processo di conversione del deidroepiandrosterone, un precursore degli androgeni prodotto principalmente dalla ghiandola surrenale, in diidrotestosterone (Hettel & Sharifi, 2017).



**Figura 5: La sintesi del testosterone.** L'enzima  $3\beta$ -HSD catalizza la sintesi di testosterone a partire da precursori androgenici; l'enzima  $5\alpha$ -reduttasi catalizza la conversione di testosterone in diidrotestosterone. Tratto da: Salerno. Appunti di Biochimica Clinica. 2014.

Per il corretto funzionamento di tale processo è essenziale che l'enzima 3 $\beta$ -HSD1 venga propriamente degradato.

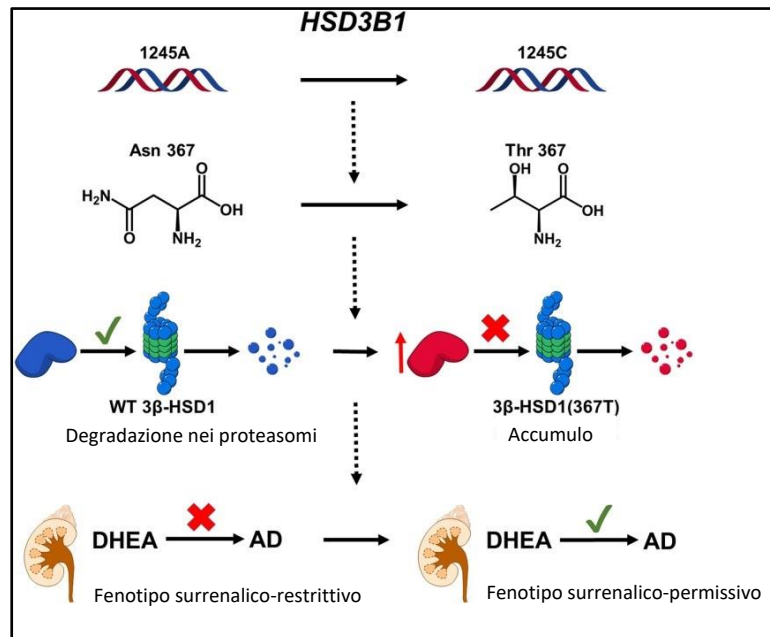
Il processo di degradazione inizia con l'ubiquitinazione, ovvero il legame tra la proteina e la molecola ubiquitina, che funge da marcatore per la proteina da degradare. L'ubiquitina è una proteina presente con minime variazioni in tutti i vertebrati, piante complesse e funghi, a dimostrazione dell'enorme vantaggio evolutivo offerto dal suo possesso (Callis, 2014).

L'ubiquitina si lega in specifici punti della proteina da degradare, codificati da una specifica sequenza nel gene corrispondente. Dopo l'ubiquitinazione, i proteasomi, che assieme ai lisosomi si occupano della disgregazione e del riciclaggio delle varie molecole presenti all'interno della cellula, degradano la proteina. In questo modo la sintesi di diidrotestosterone viene interrotta fino ad ulteriore stimolazione.

Il gene *HSD3B1* è caratterizzato a livello germinale da un polimorfismo a singolo nucleotide. L'allele predominante del gene è caratterizzato dalla presenza di un'adenina nella base azotata del 1245esimo nucleotide (*HSD3B1*(1245A)). La variante genica meno diffusa invece è caratterizzata nella stessa posizione dalla presenza di una citosina (*HSD3B1*(1245C)) (Tabella 1). Questa modifica in posizione 1245 causa la codifica della treonina invece che l'asparagina nell'amminoacido 367 dell'enzima 3 $\beta$ -HSD1. Essendo la treonina caricata negativamente al pH cellulare, questo comporta un cambio di struttura proprio nella parte dell'enzima 3 $\beta$ -HSD1 soggetta al legame con l'ubiquitina, che di conseguenza non può formarsi. L'enzima dunque non può essere degradato e il suo accumulo causa una sintesi elevata di diidrotestosterone (fenotipo surrenalico-permissivo). Questo fenotipo è presente anche negli eterozigoti, ma non in modo così accentuato.

Al contrario, la presenza dell'asparagina nell'enzima 3 $\beta$ -HSD1 permette una corretta degradazione della proteina la quale è incapace di produrre elevate quantità di androgeni partendo dai precursori derivanti dalle ghiandole surrenali (fenotipo surrenalico-restrittivo) (Figura 6).

	primo allele	secondo allele
Omozigote <i>HSD3B1</i> (1245A)		
filamento antisenso	cac aag gag a <b>a</b> c ctg aag tcc	cac aag gag a <b>a</b> c ctg aag tcc
filamento senso	gtg ttc ctc t <b>t</b> g gac ttc agg	gtg ttc ctc t <b>t</b> g gac ttc agg
Eterozigote		
filamento antisenso	cac aag gag a <b>a</b> c ctg aag tcc	cac aag gag a <b>C</b> c ctg aag tcc
filamento senso	gtg ttc ctc t <b>t</b> g gac ttc agg	gtg ttc ctc t <b>G</b> g gac ttc agg
Omozigote <i>HSD3B1</i> (1245C)		
filamento antisenso	cac aag gag a <b>C</b> c ctg aag tcc	cac aag gag a <b>C</b> c ctg aag tcc
filamento senso	gtg ttc ctc t <b>G</b> g gac ttc agg	gtg ttc ctc t <b>G</b> g gac ttc agg



**Tabella 1 e Figura 6: Varianti nella sequenza per il polimorfismo dell'*HSD3B1*.** (Tabella 1) Nella sequenza per entrambi i filamenti dei due alleli delle tre varianti genotipiche è indicato in rosso il codone interessato ed è sottolineata la base azotata che varia. Il filamento senso è il filamento di DNA con la stessa sequenza del rispettivo mRNA; il filamento antisenso serve invece da stampo per l'assemblaggio del mRNA. La lettera A indica l'adenina, la C la citosina, la G la guanina e la T la timina. Tabella creata con Microsoft Excel 2019. (Figura 6) Le diverse proteine codificate dai due alleli, con conseguente fenotipo surrenalico-restrittivo o surrenalico-permissivo. Tratto da: Sabharwal e Sharifi. *HSD3B1* Genotypes Conferring Adrenal-Restrictive and Adrenal-Permissive Phenotypes in Prostate Cancer and Beyond. *Endocrinology*. 2019. Immagine modificata dall'autrice del Lavoro di Maturità.

La frequenza del polimorfismo varia in base all'etnia: l'allele *HSD3B1*(1245C) è stato stimato essere presente nel 34% negli europei, nel 20% negli americani, nel 16% dei provenienti dall'Asia meridionale, nel 9% degli africani e nell' 8% dei provenienti dall'Asia orientale (Sabharwal & Sharifi, 2019). Si stima che più di 50% degli individui delle popolazioni occidentali possiedano almeno una copia dell'allele *HSD3B1*(1245C).

Il polimorfismo del gene *HSD3B1* è stato finora studiato soprattutto per quanto riguarda il suo influsso sulla terapia mirata per l'adenocarcinoma della prostata.

Il testosterone e il diidrotestosterone, sia prodotti dalle gonadi sia sintetizzati a partire da precursori derivanti dalla ghiandola surrenale, regolano lo sviluppo della prostata a partire dall'adolescenza (Vickman et al., 2020). Questi ormoni stimolano infatti il recettore androgenico, il quale agisce da fattore di trascrizione per i geni necessari allo sviluppo e accrescimento della prostata (Tan et al., 2015).

Una delle terapie maggiormente utilizzate per rallentare o bloccare lo sviluppo del tumore è conseguentemente la castrazione chimica, ovvero una terapia basata sulla soppressione degli androgeni (Sharifi, Gulley & Dahut, 2005).

La castrazione chimica è attuata tramite la somministrazione di farmaci che inibiscono la sintesi di ormoni androgeni da parte delle gonadi. Un meccanismo comune a gran parte dei farmaci che possono essere usati a questo scopo è infatti quello di contrastare l'azione dell'ormone luteinizzante, il quale si occupa di regolare l'attività dei testicoli e quindi la sintesi di ormoni androgeni.

Tuttavia, la sintesi dei precursori degli androgeni da parte della ghiandola surrenale non è compromessa. Di conseguenza, una certa quantità di diidrotestosterone può ancora essere sintetizzata e in seguito andare a stimolare i recettori androgenici delle cellule prostatiche (Hettel & Sharifi, 2017).

La gravità dell'adenocarcinoma della prostata dipende anche dalla inevitabile resistenza contro le terapie, che è dovuta proprio alla ricorrente stimolazione del recettore androgenico da parte di diidrotestosterone sintetizzato da precursori surrenali (Hearn et al., 2020).

Dal momento che in presenza della variante genica *HSD3B1*(1245C) tale sintesi alternativa alla via gonadica di diidrotestosterone è favorita, essa determina anche uno sviluppo più rapido della resistenza alla castrazione chimica. Ciò è stato dimostrato con uno studio effettuato su 443 pazienti, dei quali si è verificato il genotipo *HSD3B1* e confrontato con il tempo di sopravvivenza libera da progressione dell'adenocarcinoma dopo la castrazione chimica. Per 219 uomini omozigoti per l'allele *HSD3B1*(1245A), è stata osservata una sopravvivenza libera da progressione pari a 6.6 anni, per gli eterozigoti 4.1 anni ed infine per gli omozigoti per l'allele *HSD3B1*(1245C) 2.5 anni (Hettel & Sharifi, 2017).

In presenza della variante genica meno diffusa, dunque, l'efficacia della terapia di soppressione degli androgeni è drasticamente ridotta. Sono da considerare gli effetti collaterali della terapia, quali vampate di calore, diminuzione della densità ossea, disturbi metabolici, diminuzione del desiderio e della potenza sessuale e sbalzi d'umore, che comportano quindi un peggioramento della qualità di vita del paziente (Sharifi, Gulley & Dahut, 2005). Svolgere un'analisi genetica sui candidati a tale terapia per rilevare l'eventuale presenza della variante genica potrebbe quindi permettere di determinare l'efficacia del trattamento; in data attuale, tale test è indicato da molti esperti come potenzialmente molto importante a fini terapeutici, tuttavia non è ancora entrato nella pratica clinica.

Il polimorfismo dell'*HSD3B1* è anche stato studiato nell'asma, una condizione respiratoria caratterizzata dal restringimento delle vie respiratorie. L'asma è tenuta sotto controllo principalmente tramite due tipi di farmaci: i farmaci antiinfiammatori, che riducono l'infiammazione che restringe le vie respiratorie, e i farmaci broncodilatatori, che agiscono favorendo la dilatazione dei bronchi. Gli antiinfiammatori più comunemente usati sono degli ormoni glucocorticoidi, ormoni steroidei che nell'uomo sono prodotti principalmente dalla ghiandola surrenale. Purtroppo la resistenza alla terapia tramite glucocorticoidi, causante quindi un grado più grave di asma, rappresenta un problema ampiamente diffuso.

Nei pazienti affetti da tale forma grave di asma, recenti studi hanno individuato un potenziale beneficio dato dalla stimolazione del recettore androgenico da parte del testosterone e del diidrotestosterone. Tale risultato potrebbe essere spiegato dall'effetto degli androgeni sulla

muscolatura liscia del sistema respiratorio; ad esempio, il testosterone sembrerebbe promuoverne il rilassamento.

Un effetto collaterale della terapia tramite glucocorticoidi è tuttavia quello di inibire la sintesi di ormoni androgeni endogeni, soprattutto gonadici. Nei pazienti aventi almeno un allele *HSD3B1*(1245C), tale deficit può essere compensato dalla conversione di precursori androgenici surrenali in diidrotestosterone; nei pazienti omozigoti per l'allele *HSD3B1*(1245A), tuttavia, tale deficit può comportare un netto peggioramento dell'asma, e quindi la resistenza alla terapia. Nel caso dell'asma, dunque, il possesso dell'allele *HSD3B1*(1245C) indica maggiore efficacia della terapia tramite glucocorticoidi. Per gli omozigoti per l'allele *HSD3B1*(1245A) c'è invece da prevedere resistenza alla terapia; questi pazienti beneficerebbero piuttosto di una terapia basata sugli androgeni (Zein et al., 2020).

Studi di minore entità hanno inoltre studiato il polimorfismo in rapporto ad altri aspetti clinici influenzati dagli androgeni, quali la densità mammaria, l'alopecia e l'ipertensione (Sabharwal & Sharifi, 2019).

### **1.3.3. Il recettore androgenico**

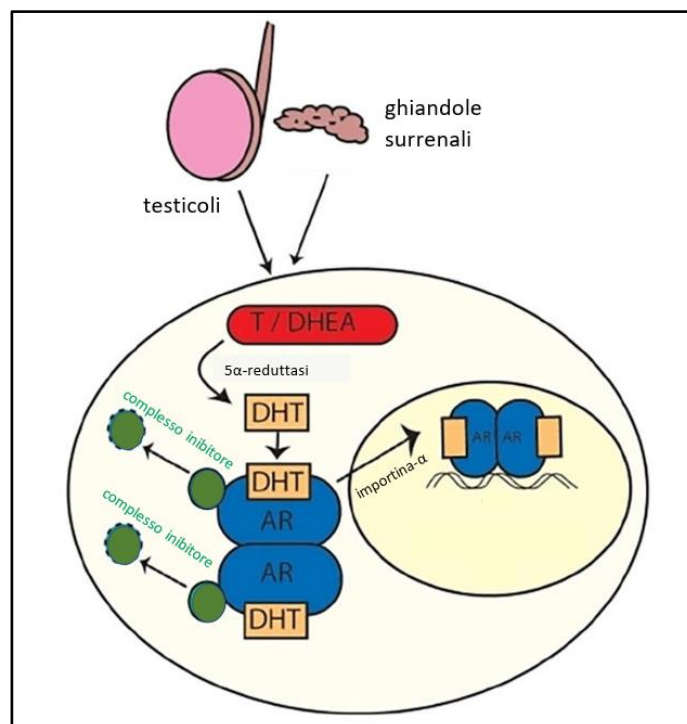
Il recettore androgenico appartiene alla famiglia dei recettori steroidei nucleari, ed è codificato da una sequenza di DNA sul cromosoma sessuale X.

Le principali strutture che compongono il recettore androgenico sono la porzione amminoterminale, caratterizzata da un gruppo funzionale amminico, la porzione centrale, la porzione cerniera, funzionale al mantenimento della struttura e della flessibilità del recettore, e la porzione carbossiterminale, caratterizzata dalla presenza di un acido carbossilico (Vickman et al., 2020).

I due principali ormoni androgeni endogeni, testosterone e diidrotestosterone, possono entrambi legarsi al recettore. Tuttavia, a causa di una piccola differenza strutturale, l'affinità tra ligando e recettore è raddoppiata per quanto riguarda il diidrotestosterone rispetto al testosterone, motivo per cui il diidrotestosterone è considerato un androgeno più forte. In assenza del ligando, il recettore androgenico si trova nel citoplasma legato ad altre proteine. Queste formano un complesso con una configurazione tale da favorire il legame del recettore con il diidrotestosterone. Tale complesso è detto complesso inibitore, in quanto copre la regione del recettore funzionale al legame con il DNA, rendendolo quindi inattivo. Il recettore androgenico viene attivato nel citoplasma dal legame con qualsiasi ormone androgeno. L'ormone androgeno viene trasportato alla cellula attraverso proteine ematiche ed entra al suo interno attraversando la membrana plasmatica.

A contatto con il recettore androgenico, l'ormone si lega con la sua porzione carbossiterminale. Questo legame permette al complesso inibitore di staccarsi. Una volta attivato, il recettore androgenico è trasferito nel nucleo grazie alla proteina importina- $\alpha$ . Nel nucleo, la porzione amminoterminale del recettore favorisce il legame con altro recettore androgenico formando così un dimero. La porzione centrale del recettore riconosce specifiche

sequenze di DNA, alle quali si lega e ne fa aumentare la velocità di trascrizione attivando specifiche proteine, dette promotrici e intensificatrici della trascrizione (Figura 7). Le sequenze di DNA riconosciute dalla porzione centrale del recettore, lunghe solitamente una quindicina di basi azotate, sono chiamate elementi di risposta, e sono unite ai geni da trascrivere. Per il recettore androgenico due esempi di questi geni sono l'antigene prostatico specifico, funzionale al rilascio degli spermatozoi dal coagulo che li avvolge dopo l'eiaculazione, e il gene *TMPRSS2* (Vickman et al., 2020). La sequenza di DNA coinvolta è dunque trascritta più spesso su mRNA, che uscendo dal nucleo si trasferisce nel citoplasma ove i ribosomi lo traducono nelle proteine codificate, compresa la proteasi *TMPRSS2*, che come già spiegato è la responsabile dell'attivazione della proteina spike durante l'infezione da SARS-CoV-2.



**Figura 7: Funzionamento del recettore androgenico (AR).** Il testosterone (T) e il deidroepiandrosterone (DHEA) provenienti dalle gonadi e dalle ghiandole surrenali sono convertiti in diidrotestosterone (DHT) dall'enzima 5α-reduttasi, e si legano al recettore androgenico inducendone la dimerizzazione e il rilascio dal complesso inibitore. La proteina importina-α trasporta il dimero nel nucleo ove agisce da fattore di trascrizione. Tratto da: National Cancer Institute. New Treatment Target Identified for Key Prostate Cancer Driver. NIH. 2016. Immagine modificata dall'autrice del Lavoro di Maturità.



## 2. Scopo

Lo scopo di questa ricerca è di osservare la potenziale correlazione tra le varianti alleliche per il polimorfismo dell'*HSD3B1* e il decorso dell'infezione da SARS-CoV-2 in un gruppo di pazienti testati positivi al COVID-19 e ospedalizzati in Ticino durante la prima ondata pandemica. Secondo l'ipotesi di ricerca, i pazienti che possiedono l'allele *HSD3B1*(1245C) sarebbero maggiormente a rischio di un decorso grave, dato che l'allele *HSD3B1*(1245C) porta ad una maggiore stimolazione del recettore androgenico, che a sua volta causa un'elevata espressione della proteina TMPRSS2, e probabilmente anche dell'enzima ACE2, entrambi fondamentali al meccanismo di infezione virale. In particolare, gli omozigoti per l'allele *HSD3B1*(1245C) sarebbero più a rischio degli eterozigoti, mentre gli omozigoti per l'allele *HSD3B1*(1245A) sarebbero meno a rischio rispetto agli altri pazienti. L'Europa, l'Italia e la Spagna sono le regioni con la maggiore frequenza dell'allele *HSD3B1*(1245C). Dal momento che queste nazioni sono tra le più gravemente colpiti dalla pandemia, ciò sostiene l'ipotesi di una correlazione tra il possesso di questo allele ed un più elevato rischio di un decorso grave dell'infezione da SARS-CoV-2 (Sharifi & Ryan, 2020).

Un risultato positivo di questo studio potrebbe quindi indicare un importante dato nello studio del SARS-CoV-2, approfondendo il coinvolgimento degli ormoni androgeni nell'infezione e individuando fattori genetici che possono predisporre ad uno specifico decorso.

Avendo a disposizione anche dati quali le comorbidità e altri parametri riguardanti lo stato di salute dei pazienti coinvolti, questa ricerca permette anche un ulteriore studio delle varie condizioni che possono rappresentare un fattore di rischio di fronte alla malattia COVID-19. Dati di questo genere sono fondamentali per poter affrontare meglio la pandemia ed individuare precocemente i pazienti maggiormente a rischio, che necessitano dunque di maggiore protezione. Inoltre, lo studio dell'infezione da SARS-CoV-2 può fornire dati importanti anche per la gestione di eventuali future epidemie causate dai coronavirus.

## 3. Pazienti e metodi

La parte pratica della ricerca sulla quale si incentra questo Lavoro di Maturità consiste nel caratterizzare il genotipo del gene *HSD3B1*.

Lo studio è stato condotto su 400 pazienti risultati positivi al COVID-19 e ospedalizzati all'Ente Ospedaliero Cantonale, presso l'ospedale la Carità di Locarno, o alla Clinica Luganese Moncucco durante la prima ondata in Ticino della pandemia. Il primo paziente ospedalizzato è stato registrato il 29 febbraio 2020; l'ultimo è entrato in cura il 22 maggio 2020. Per ogni paziente sono state raccolte informazioni sullo stato di salute ed è stata quantificata la gravità dell'infezione secondo la scala emessa a tale scopo dalla WHO (Tabella 2) (WHO, 2020).

Livello	Caratteristiche
1	assenza di limitazioni nell'attività
2	presenza di limitazioni nell'attività
3	ospedalizzazione
4	ospedalizzazione; ossigenazione tramite maschera o tubi nasali
5	ospedalizzazione; ventilazione senza intubazione
6	ospedalizzazione; ventilazione tramite intubazione
7	ospedalizzazione; ventilazione tramite intubazione; sostegno a livello di diversi organi
8	decesso per COVID-19

**Tabella 2: Scala WHO per la quantificazione della gravità dell'infezione da SARS-CoV-2.** Tabella creata con Microsoft Excel 2019.

A nessuno dei pazienti è stato somministrato cortisone, un ormone spesso utilizzato come antiinfiammatorio nelle infezioni respiratorie. L'utilizzo di questo ormone per curare il COVID-19 è infatti iniziato posteriormente alla prima ondata. Per questo motivo, includere pazienti delle ondate successive sarebbe stato sconsigliabile, in quanto si sarebbe aggiunto un ulteriore parametro da considerare.

Essendo il polimorfismo innato e quindi presente in qualsiasi cellula somatica dell'organismo, il gene *HSD3B1* è stato caratterizzato utilizzando qualsiasi tipo di tessuto prelevato dal paziente interessato. Per questo studio sono stati dunque scelti pazienti dei quali era disponibile una quantità sufficiente di tessuto negli archivi dell'Istituto Cantonale di Patologia, risalente a qualsiasi intervento chirurgico precedente all'infezione da SARS-CoV-2. Tutti i pazienti sono stati informati dello studio e coloro che hanno accettato hanno firmato l'autorizzazione al riutilizzo del proprio materiale a scopo di ricerca. Per i pazienti deceduti non è invece stato necessario richiedere un'autorizzazione, secondo le linee guida del Comitato Etico del Cantone Ticino.

Tutti gli esperimenti sono stati svolti utilizzando guanti sterili e in alcuni passaggi il lavoro è stato eseguito sotto una cappa ventilata precedentemente sterilizzata con raggi UV in modo da evitare qualsiasi tipo di contaminazione.

### 3.1. Procedimenti

#### 3.1.1. Estrazione del DNA

Il materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE) necessario all'estrazione del DNA è stato rimosso dai rispettivi vetrini con l'aiuto di un bisturi sterile. Per ogni campione il DNA è stato prelevato da 6 tagli (ogni taglio disposto su un vetrino diverso) dello spessore di 4 µm. Prima di procedere con la tecnica dello scraping, l'area d'interesse precedentemente segnata dal patologo sul vetrino con la colorazione ematossilina eosina (HE) è stata riportata su tutti i

vetrini non colorati. Il materiale raccolto da tutti i vetri non colorati è stato raggruppato in un'unica provetta da 2.2 ml.

Tutto il processo è stato eseguito con molta attenzione, in modo da evitare la contaminazione tra diversi pazienti. Al termine dello scraping di ogni paziente, il piano di lavoro è stato disinfettato e i guanti da laboratorio sostituiti, così come il bisturi.

Il DNA è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA).

Inizialmente le provette, ognuna contenente il tessuto ottenuto tramite lo scraping di un singolo campione biologico, sono state centrifugate a 13200 rpm per un minuto, in modo da raccogliere il materiale sul fondo.

In seguito le provette sono state trasferite sotto cappa, precedentemente sterilizzata con un ciclo di raggi ultravioletti di 15 minuti, in modo da garantire un ambiente sterile.

In ogni provetta sono stati aggiunti 160  $\mu$ L di una soluzione di deparaffinazione, e il tutto è stato miscelato con il vortex per 15 secondi. Le provette sono state incubate per 3 minuti a 56°C in un termoblocco senza agitazione e poi centrifugate per altri 10 secondi a 13200 rpm. A questo punto la soluzione aveva agito, sciogliendo la paraffina e liberando dunque il tessuto. Successivamente si è proceduto con una prima disgregazione del tessuto, usando l'enzima proteinasi K.

Alle provette sono stati aggiunti sotto cappa 180  $\mu$ L di buffer ATL, precedentemente riscaldato a bagnomaria, necessario a garantire le condizioni ottimali all'azione della proteinasi K. Il termine inglese buffer indica una soluzione tampone, dunque una soluzione in grado di opporsi alle variazioni di pH. In seguito sono stati aggiunti 20  $\mu$ L di proteinasi K. Le provette sono state sigillate con parafilm e miscelate con il vortex e successivamente incubate per un'ora a 56°C (temperatura necessaria ad attivare la proteinasi K) in un termoblocco senza agitazione. Per disattivare la proteinasi K, le provette sono state incubate per un'ulteriore ora in un termoblocco senza agitazione a 90°C.

Le provette sono state quindi centrifugate per 10 secondi a 13200 rpm. La fase chiara sottostante è stata trasferita in una nuova provetta da 1.5 mL mentre la fase soprastante, contenente la paraffina disciolta, è stata eliminata.

Ad ogni provetta sono stati aggiunti 200  $\mu$ L di buffer AL, in modo da disgregare la membrana nucleare e permettere il rilascio del DNA. Il contenuto della provetta è stato miscelato con il vortex per 15 secondi e centrifugato per 10 secondi a 13200 rpm. Lo stesso procedimento è stato ripetuto dopo l'aggiunta di 200  $\mu$ L di etanolo puro, utilizzato per fissare il DNA.

Tutto il contenuto della provetta è stato trasferito su una colonna contenente una membrana caricata positivamente, in modo da permettere al DNA, caricato negativamente, di potersi legare elettrostaticamente.

La provetta è stata nuovamente centrifugata per un minuto a 800 rpm, dopodiché si è eliminato il tubo esterno contenente il materiale di scarto. In seguito sono stati aggiunti 500  $\mu$ L di due cosiddetti wash buffer; dopo ogni aggiunta, la provetta è stata centrifugata, alla stessa intensità e durata del passaggio precedente, e il tubo esterno è stato eliminato. I tubi sono stati nuovamente centrifugati, questa volta senza l'aggiunta di alcun reagente, per 3 minuti a 13200 rpm, in modo da permettere l'eliminazione completa di qualsiasi liquido

rimasto nel filtro. Le colonne sono state spostare su una nuova provetta da 1.5 mL alla quale sono stati aggiunti 50  $\mu\text{L}$  di buffer ATE in modo da azzerare le cariche presenti e permettere al DNA di staccarsi dalla membrana. La provetta è stata lasciata in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente. Infine la provetta è stata centrifugata un'ultima volta, per 1 minuto a 13200 rpm, e la colonna è stata eliminata.

La concentrazione ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) del DNA è stata determinata tramite uno spettrofotometro: Nanodrop 1000 (Witec, Littau, CH). Prima di procedere con la quantificazione, la fibra ottica è stata pulita con acqua deionizzata e lo spettrofotometro è stato tarato con il buffer ATE.

Durante lo svolgimento dell'intera procedura, ogni volta prima di rientrare sotto cappa i guanti sono stati cambiati in modo da evitare ogni tipo di contaminazione.

### 3.1.2. Reazione a catena della polimerasi

Per poter eseguire la reazione a catena della polimerasi (PCR), metodica utilizzata per amplificare in grandi quantità specifici frammenti di DNA, la soluzione madre di DNA è stata diluita con acqua deionizzata fino ad una concentrazione finale di 25  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

Per la PCR sono stati usati 2  $\mu\text{L}$  della soluzione di DNA diluita, in modo da avere una quantità finale di 50 ng di DNA per campione. Come controllo positivo è stato usato un campione precedentemente analizzato in cui era già stata accertata la variante genica, mentre come controllo negativo è stato utilizzato un campione contenente acqua deionizzata invece che materiale genetico.

La mix di reagenti necessari per lo svolgimento della PCR è stata preparata calcolando un campione in eccesso, in modo da compensare eventuali perdite di liquido causate da errori di volume durante le operazioni di pipettamento. Per ogni campione sono stati utilizzati 0.4  $\mu\text{L}$  di Taq polimerasi (AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase 1000U, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts USA), proveniente dal batterio *Thermus aquaticus* (Kim et al., 1995), 14  $\mu\text{L}$  di acqua deionizzata, 2.5  $\mu\text{L}$  di buffer PCR e 3  $\mu\text{L}$  di cloruro di magnesio. Inoltre sono stati aggiunti i nuovi nucleotidi necessari all'ampliamento del DNA: 0.5  $\mu\text{L}$  di nucleotidi dNTP e 0.1  $\mu\text{L}$  di nucleotidi dUTP. Infine sono stati aggiunti 1.25  $\mu\text{L}$  dei rispettivi primer forward, agenti sui filamenti di DNA antisenso, e dei primer reverse, agenti sui filamenti di DNA senso (Tabella 3). I primer sono sequenze di nucleotidi che fungono da innesco per la Taq polimerasi nella PCR, o per la DNA polimerasi III nella normale replicazione del DNA. A dipendenza del primer scelto, la PCR amplifica il DNA solo dopo il punto di inserzione di quest'ultimo; per determinare il genotipo dell'*HSD3B1* infatti non è necessario l'intero gene, ma è sufficiente la parte contenente la base azotata variabile. Per ogni campione sono stati aliquotati 23  $\mu\text{L}$  della mix precedentemente preparata e 2  $\mu\text{L}$  delle rispettive diluizioni di DNA, facendo attenzione a pipettare il tutto sul fondo della provetta e a non creare bolle.

HSD3B1 Forward Primer	5'-GTCAAATAGCGTATTCACCTTCTCTTAT-3'
HSD3B1 Reverse Primer	5'-GAGGGTGGAGCTTGATGACATCT-3'

**Tabella 3: Primer usati per la PCR.** I primer forward e reverse che sono stati usati per l'amplificazione del DNA sono specifici per il gene *HSD3B1*. La lettera A indica l'adenina, la C la citosina, la G la guanina e la T la timina. Sequenze tratte da: Hearn et al. *HSD3B1* and resistance to androgen-deprivation therapy in prostate cancer: a retrospective, multicohort study. *The Lancet Oncology*. 2016. 1435-1444. Tabella creata con Microsoft Excel 2019.

A questo punto le provette sono state inserite nel termociclatore. Il materiale genetico è stato amplificato utilizzando il seguente profilo termico, adatto e specifico all'amplificazione del frammento (Tabella 4). Dopo due cicli iniziali della durata di 2 minuti a 50°C e 10 minuti a 95°C, un ciclo di incubazioni più brevi, durante il quale è avvenuta un'amplificazione esponenziale del DNA, è stato ripetuto per 40 volte. La prima parte di questo ciclo è la denaturazione (15 secondi a 95°C), ovvero la separazione dei due filamenti costituenti la doppia elica di DNA. Durante la seguente incubazione di 30 secondi a 67°C i primer si sono attaccati alle loro regioni complementari di DNA; questa fase è chiamata annealing. In una terza incubazione, di 30 secondi a 72°C, la Taq polimerasi ha formato nuovi filamenti di DNA, usando come stampo quelli denaturati. Questa fase è chiamata prolungamento, ed è continuata anche per l'ultima incubazione successiva ai 40 cicli (3 minuti a 72°C). Infine, l'ultimo ciclo a 10°C ha terminato la reazione di amplificazione. Una volta rimosse dal termociclatore, le provette sono state centrifugate con un programma veloce in modo da raccogliere tutto il materiale sul fondo ed evitare così perdite di DNA amplificato causate dall'evaporazione. I campioni amplificati possono essere conservati in frigorifero a 4°C fino ad un paio di giorni.

50°C	2 minuti	
95°C	10 minuti	
95°C	15 secondi	
67°C	30 secondi	
72°C	30 secondi	
72°C	3 minuti	

**Tabella 4: Profilo termico della PCR.** I cicli sono specifici all'azione dell'enzima Taq polimerasi coinvolto; i 40 cicli di brevi incubazioni permettono l'aumento esponenziale del DNA, che avviene secondo le fasi di denaturazione, annealing e prolungamento. Tabella creata con Microsoft Excel 2019.

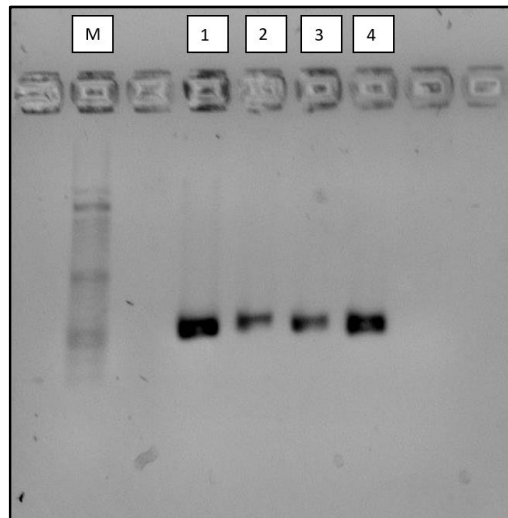
### 3.1.3. Verifica dell'amplificato su gel di agarosio

L'amplificazione del DNA è stata valutata attraverso l'elettroforesi su gel di agarosio. Il gel di agarosio è stato preparato in laboratorio sciogliendo nel microonde 1.8 g di agarosio, un polisaccaride, in 100 mL di buffer TBE. Il gel è stato in seguito versato in una vaschetta con

un pettine, utilizzato per creare fenditure verticali, chiamate pozzetti, utilizzate per caricare il DNA amplificato. Il tutto è stato lasciato raffreddare per circa un'ora, dopodiché il pettine è stato rimosso e il gel ormai solido è stato trasferito e conservato in frigorifero a 4°C in una vaschetta contenente il buffer TBE.

Al momento dell'utilizzo del gel, quest'ultimo è stato posizionato all'interno dell'apposito apparecchio. Il marker, ovvero una soluzione di frammenti di DNA di diverse lunghezze, è stato utilizzato come scala di riferimento per stabilire la lunghezza dei filamenti di DNA ottenuti dalla PCR. Questa miscela è stata preparata unendo 1 µL di DNA marker a 5 µL di buffer TBE e 2 µL di un'altra soluzione costituita da coloranti: 0.5 µL di Midori Green, 1 µL di Loading Dye e 0.5 µL di acqua deionizzata. Il tutto è stato aliquotato nel rispettivo pozzetto del gel. Successivamente, 5 µL di ogni campione amplificato sono stati dapprima miscelati con 2 µL della soluzione contenente il Midori Green e il Loading Dye e in seguito pipettati nei rispettivi pozzetti dopo il marker. I vari frammenti sono stati attratti dal polo positivo attraverso un flusso di corrente pari a 100 Volt. I frammenti di dimensioni più ridotte sono migrati più velocemente in quanto maggiormente facilitate ad attraversare i pori che costituiscono il gel di agarosio.

Il gel è stato visualizzato con una lampada ad ultravioletti per poter essere quindi valutato (Figura 8).



**Figura 8: Immagine dell'amplificato ottenuta con la lettura tramite raggi ultravioletti.** Sotto il secondo pozzetto si osserva la scala formata dal marker (M); dai quattro pozzetti centrali (1-4) partono le bande di DNA amplificato tramite la PCR. Immagine scattata al Laboratorio di Patologia Molecolare dell'Istituto Cantonale di Patologia.

#### **3.1.4. Purificazione post PCR**

Prima di procedere con il sequenziamento, il prodotto della PCR è stato purificato in modo da eliminare eventuali rimasugli di sale, primers o nucleotidi in eccesso. I controlli positivi e negativi sono serviti unicamente per la PCR, quindi non sono stati sequenziati.

I campioni sono stati dapprima centrifugati in modo da portare tutto il materiale sul fondo della provetta per evitare contaminazione dovute alle gocce di aerosol presenti sul tappo della provetta, al momento dell'apertura della stessa. Successivamente, sotto cappa, ad ogni provetta PCR contenente il DNA amplificato sono stati aggiunti 190 µL di binding buffer. La miscela è quindi stata trasferita in provette da 2 mL munite di un filtro. Il binding buffer ha agito legando il DNA a questo filtro. Le provette sono state successivamente centrifugate per 5 minuti a 12000 rpm, dopodiché i filtri sono stati trasferiti in nuove provette da 1.5 mL e quelle precedenti invece sono state buttate.

Ad ogni nuova provetta sono stati aggiunti direttamente nel filtro 20 µL di elution buffer e lasciato agire per 1 minuto a temperatura ambiente. In questo modo le cariche tra la membrana presente nel filtro e il DNA si sono azzerate. Infine, le provette sono state nuovamente centrifugate per 1 minuto a 10000 rpm e il filtro è stato eliminato.

Tutte le provette così come i reagenti utilizzati per questo passaggio di purificazione sono state fornite dal kit MSB® Spin PCRapace (INVITEK Molecular, D-13125 Berlin).

#### **3.1.5. Cycle Sequencing**

Il processo del cycle sequencing è analogo a quello della PCR classica descritto precedentemente. La differenza principale consiste nella presenza di terminatori fluorocromati. Quando la Taq polimerasi incorpora nella replicazione del DNA un terminatore fluorocromato il prolungamento del filamento viene interrotto, in quanto a causa della loro struttura i dideossinucleotidi impediscono il legame con il nucleotide successivo. Il risultato di questo procedimento è la formazione di frammenti di DNA di diverse lunghezze che coprono l'intera regione del gene d'interesse.

Per il cycle sequencing sono stati utilizzati unicamente i primer reverse; il DNA è dunque stato allungato basandosi solamente sul filamento senso.

Per ogni campione è stata preparata una mix di reagenti costituita da 6.6 µL di acqua deionizzata, 1.5 µL di sequencing buffer, 0.5 µL di reverse primer e 1 µL di terminatori RR-2500 (TRR). La soluzione TRR è costituita dalla Taq polimerasi e da 4 differenti terminatori fluorocromati, uno per ciascuna base azotata. I terminatori fluorocromati sono dei dideossinucleotidi contrassegnati con fluorocromi sensibili alla luce che emettono diverse lunghezze d'onda a dipendenza della base azotata a cui sono legati. I dideossinucleotidi sono molecole che si differenziano dai normali nucleotidi per l'assenza di due gruppi idrossilici necessari al legame con i nucleotidi successivi.

Il mix di reagenti, contenuto in una provetta da 1.5 mL, è stato miscelato con il vortex e centrifugato con un programma veloce. Successivamente sono state preparate le provette per

la PCR, nelle quali sono stati pipettati 0.4  $\mu$ L di DNA del rispettivo campione e 9.6  $\mu$ L della mix di reagenti, per un volume finale di 10  $\mu$ L.

Le provette sono state inserite nel termociclatore e amplificate utilizzando il programma cycle sequencing (Tabella 5). Terminato il cycle sequencing, le provette possono essere conservate in frigorifero a 4°C per alcuni giorni.

96°C	1 minuto	
96°C	10 secondi	
50°C	5 secondi	
60°C	4 minuti	
4°C	hold	

**Tabella 5: Profilo termico del cycle sequencing.** Il processo è simile alla PCR descritta precedentemente, ma si distingue per la presenza di marcatori fluorocromati. Tabella creata con Microsoft Excel 2019.

### 3.1.6. Purificazione post cycle sequencing

Come dopo la prima PCR, il prodotto ottenuto con il cycle sequencing è stato purificato per rimuovere gli eccessi di reagenti.

Inizialmente le provette sono state centrifugate con un programma veloce per rimuovere l'evaporazione dai bordi.

Per ogni campione una provetta contenente un filtro fornita dal kit PERFORMA® Gel Filtration Cartridges (EdgeBio, San Jose, CA 95131 USA) è stata centrifugata per 3 minuti a 3000 rpm, in modo da eliminare il liquido contenuto per mantenere umido il filtro; le provette sono state in seguito eliminate e i filtri sono stati trasferiti in nuove provette da 1.5 mL fornite dallo stesso kit.

In ognuna di queste nuove provette sono stati trasferiti i 10  $\mu$ L di soluzione post cycle sequencing. Per filtrare e quindi purificare dai residui l'amplificato, le provette sono state nuovamente centrifugate per 3 minuti a 3000 rpm. Infine, il filtro è stato gettato mentre la soluzione contenente il DNA purificato è stata essiccata per 45 minuti a 30 °C.

### 3.1.7. Sequenziamento tramite elettroforesi capillare

L'ultima fase del processo è stato il sequenziamento vero e proprio, che è avvenuto con un processo automatizzato.

Sotto cappa è stata preparata la piastra contenente le sequenze da analizzare. Ad ogni campione di DNA sono stati aggiunti 15  $\mu$ L di formammide, un reagente che indebolisce i legami tra le basi azotate dei due filamenti complementari del DNA, favorendo dunque la denaturazione. Il sequenziatore è dotato di 4 capillari che corrispondono anche al numero massimo di campioni che può analizzare contemporaneamente. Per questo motivo è



necessario caricare i campioni sempre in multiplo di 4 in modo da evitare che i capillari aspirino aria e si danneggino. Se i campioni non sono sufficienti a raggiungere ciò, i pozzetti vuoti vengono riempiti con formamide.

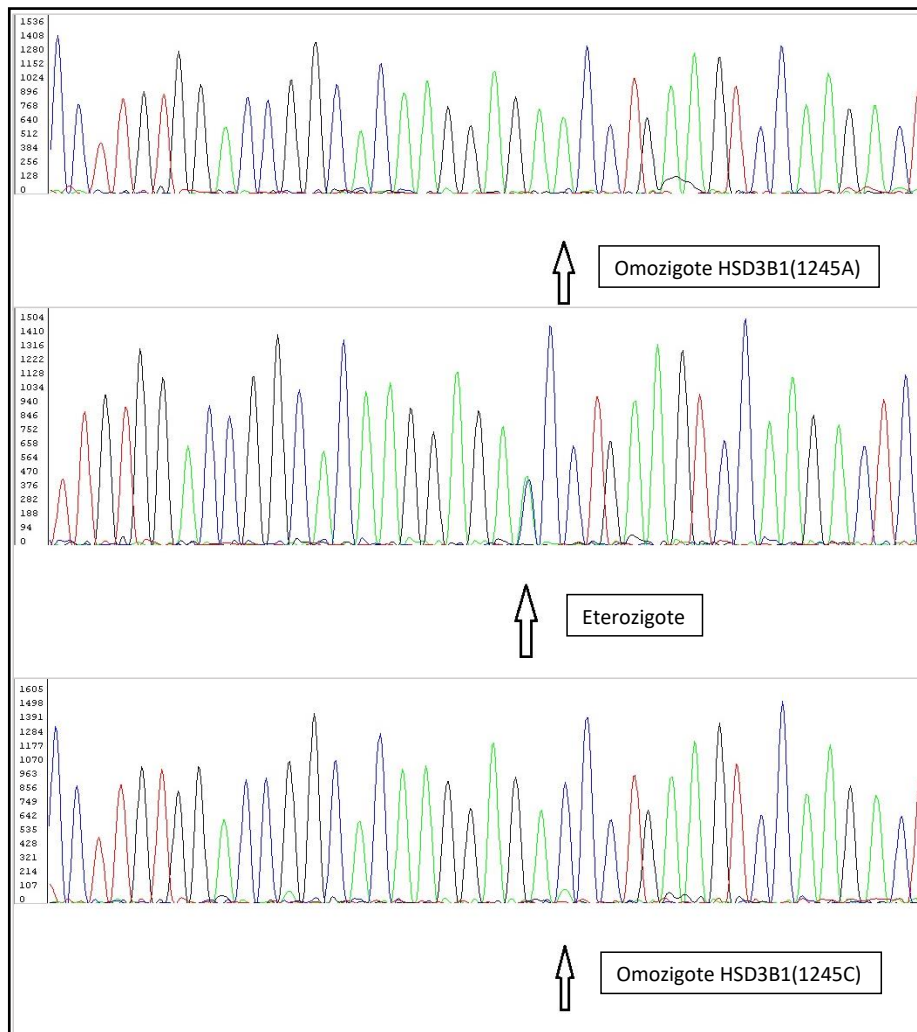
La piastra è stata centrifugata per raccogliere il liquido sul fondo dei pozzetti. In seguito è stata incubata a 95°C per 2 minuti in modo da permettere la denaturazione del DNA. Successivamente, la piastra è stata riposta in frigorifero a 4°C per almeno 10 minuti in modo da interrompere il processo di denaturazione.

La piastra è stata dapprima impostata sul programma Plate Manager (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e in seguito inserita nel sequenziatore SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), il quale ha eseguito automaticamente l'elettroforesi capillare. Ai capillari è stata applicata una corrente, con l'anodo posto in corrispondenza dei campioni. I diversi frammenti di DNA sono dunque migrati verso il catodo; quelli di dimensioni più piccole sono migrati più velocemente rispetto a quelli di dimensioni maggiori. In questo modo per ogni campione di DNA i frammenti si sono ordinati dal più piccolo al più grande. Le basi azotate finali di ogni frammento, osservate in ordine, corrispondevano dunque all'intera sequenza del gene *HSD3B1*. Mentre i frammenti ordinati si spostavano nei capillari, sono stati colpiti da una luce laser. Il laser ha eccitato gli elettroni dei terminatori fluorocromati, ovvero li ha fatti passare temporaneamente ad un livello energetico superiore a quello del loro orbitale abituale. Quando gli elettroni eccitati sono ritornati al loro stato normale, hanno emesso energia sotto forma di fluorescenza. Dal momento che le lunghezze d'onda, e quindi il colore di tale fluorescenza, erano specifiche al terminatore fluorocromato associato a una delle quattro basi azotate, tramite il rilevamento della fluorescenza da parte di un sensore associato al programma Sequencing Analysis Software 7 (Applied Biosystems) è stato possibile risalire all'ordine esatto delle basi azotate che compongono il gene (verde: adenina; rosso: timina; blu: citosina e nero: guanina).

### 3.1.8. Criteri di valutazione

Per l'analisi delle sequenze è stato utilizzato il programma Sequencing Analysis Software 7. La lettura della sequenza viene eseguita normalmente basandosi sul filamento antisenso. In questo caso, avendo sequenziato unicamente il filamento senso, con il software precedentemente citato si è creato il rispettivo filamento complementare in modo da agevolare l'interpretazione.

Per individuare il polimorfismo ci si è concentrati sulla base azotata presente in posizione 1245 del gene *HSD3B1* (Figura 9). Per orientarsi sulla sequenza è stato necessario prendere come riferimento i codoni circondanti la base azotata d'interesse e cercare la rispettiva sequenza di colori sull'immagine. Una volta ottenute le sequenze, i campioni sono stati suddivisi in tre gruppi basandosi sul polimorfismo del gene *HSD3B1*: P1245A (omozigote *HSD3B1*(1245A)), P1245C (omozigote *HSD3B1*(1245C)) e P1245A>C (eterozigote).



**Figura 9: Sequenziamento delle tre varianti per il polimorfismo dell'*HSD3B1*.** In verde sono indicate l'adenina, in rosso la timina, in blu la citosina e in nero la guanina. L'asse delle ascisse indica l'intensità della fluorescenza. I picchi più piccoli alla base sono ignorati durante la lettura. La freccia indica la base azotata portata dal nucleotide in posizione 1245. Immagine ottenuta al Laboratorio di Patologia Molecolare dell'Istituto Cantonale di Patologia con il programma Sequencing Analysis Software 7 (Applied Biosystems).

### 3.1.9 Analisi Statistiche

Sono stati eseguiti calcoli statistici per ogni possibile coppia di variabili considerata nella casistica, in modo da individuare le coppie di dati correlate significativamente. A questo scopo è stato calcolato il valore  $p$ , che permette di verificare se un'apparente correlazione tra due dati è casuale o può essere considerata statisticamente significativa: perché sia così, tale valore deve essere inferiore alla soglia di 0.05.

Sono stati adoperati i test statistici di Kruskal-Wallis, Wilcoxon-Mann Whitney, di Mood e di Fisher-Pitman, oltre ai modelli lineari generalizzati per correlare un singolo parametro a diversi altri (rapporto di verosimiglianza e test statistici di Wald). Tutti i calcoli sono stati eseguiti utilizzando il software R (R Core Team, 2020).

## 4. Risultati

### 4.1 Caratteristiche della casistica

Complessivamente sono stati analizzati 400 pazienti; di questi 234 (58.5%) uomini e 166 (41.5%) donne. Il paziente più anziano aveva 98 anni; il più giovane 29 (Tabella 6). Per quanto riguarda la casistica completa, il 18.04% (72/399) dei pazienti ha necessitato delle cure intense mentre il 19.75% (79/400) è deceduto. La permanenza in cure intense più lunga è stata di 67 giorni.

I sintomi maggiormente diffusi e associati con il COVID-19 erano febbre (294/398, 73.87%), sintomi respiratori (286/398, 71.86%) e sintomi gastrointestinali (69/398, 17.34%). Per quanto concerne le complicazioni respiratorie, il 70.93% (283/399) dei pazienti ha sviluppato una polmonite.

In generale, la presenza di comorbidità è stata riscontrata nel 74% dell'intera casistica (296/400) e il 45.5% degli individui ne presentava più di una (182/400). Nello specifico, il 25.5% (102/400) dei pazienti era affetto da diabete mellito; il 36.25% (145/400) da malattie cardiovascolari; il 52% (208/400) da ipertensione, il 21.56% (80/371) da malattie respiratorie croniche e il 15.25% (61/400) dei pazienti aveva un tumore. Inoltre, il 27.57% (94/341) dei pazienti era obeso, ovvero con BMI superiore o uguale a 30.

I pazienti sono stati suddivisi nel seguente modo: 0.5% (2/400) sono stati classificati con una scala WHO di livello 1, definito come assenza di limitazioni nell'attività; 0.25% (1/400) al livello 2, ovvero con limitazioni nell'attività; 22% (88/400) al livello 3, ovvero ospedalizzati senza bisogno di ossigeno; 45.75% (183/400) al livello 4, ovvero ospedalizzati con bisogno di ossigeno tramite maschera o tubi nasali; 4.5% (18/400) al livello 5, ovvero con richiesta di ventilazione ma senza essere intubati; 4% (16/400) al livello 6, ovvero intubati per la ventilazione; 3.75% (15/400) al livello 7, ovvero ventilati e riceventi sostegno anche a livello di altri organi; e 19.25% (77/400) al livello 8, ovvero deceduti per COVID-19.

Infine, la valutazione molecolare del polimorfismo del gene *HSD3B1* è risultata valutabile per tutti e 400 i pazienti analizzati. Più nel dettaglio, la variante polimorfica P1245A è stata riscontrata nel 39.5% (158/400) dei pazienti, la variante P1245C nel 13.75% (55/400) ed infine la variante eterozigote P1245A>C nel 46.75% (187/400). Complessivamente, l'86.25% (345/400) dei pazienti aveva almeno un allele *HSD3B1*(1245A), mentre i soggetti con almeno un allele *HSD3B1*(1245C) erano il 60.5% (242/400).

	numero di pazienti	dati disponibili	percentuale
Sesso		400	
maschile	234		58.50%
femminile	166		41.50%
Scala WHO		400	
livello 1	2		0.50%
livello 2	1		0.25%
livello 3	88		22%
livello 4	183		45.75%
livello 5	18		4.50%
livello 6	16		4%
livello 7	15		3.75%
livello 8	77		19.25%
Sintomi respiratori	286	398	71.86%
Febbre	294	398	73.87%
Sintomi gastrointestinali	69	398	17.34%
Polmonite	283	399	70.93%
Cure intense	72	399	18.05%
Diabete mellito	102	400	25.50%
Malattie cardiovascolari	145	400	36.25%
Ipertensione	208	400	52%
Malattie respiratorie croniche	80	371	21.56%
Tumore	61	400	15.25%
Comorbidità	296	400	74%
Comorbidità > 1	182	400	45.50%
BMI > 30	94	341	27.57%
Variante polimorfica		400	
P1245A	158		39.50%
P1245A>C	187		46.75%
P1245C	55		13.75%

**Tabella 6: Caratteristiche della casistica.** Dati riguardanti i 400 pazienti ammalati di COVID-19 coinvolti nello studio; percentuali in rapporto al numero di dati disponibili per ogni condizione. Tabella creata con Microsoft Excel 2019.

## 4.2 Analisi bivariate

Grazie alle analisi bivariate sono state trovate correlazioni statisticamente significative tra il sesso maschile e la necessità di ricovero nel reparto di cure intense ( $p=0.00038$ ), lo sviluppo di febbre ( $p=0.0348$ ), la presenza di malattie cardiovascolari come comorbidità ( $p=0.0242$ ) e una classificazione nella metà superiore della scala WHO (5-8) ( $p=0.0349$ ).

Inoltre, indipendentemente dal sesso, il decesso è stato correlato al ricovero in cure intense ( $p<1*10^{-4}$ ) e alla presenza di una o più comorbidità; in particolare al diabete ( $p=0.03$ ), alle malattie cardiovascolari ( $p<1*10^{-4}$ ), all'ipertensione ( $p=0.0179$ ) e al tumore ( $p=0.00315$ ). Al

contrario non sono state trovate associazioni statisticamente significative tra la probabilità di morte e la polmonite, i sintomi respiratori cronici e i sintomi respiratori causati dall'infezione da SARS-CoV-2. Il ricovero in cure intense è stato a sua volta significativamente correlato con lo sviluppo di sintomi respiratori ( $p=0.0339$ ), con la manifestazione di polmonite ( $p=0.015$ ), con il diabete ( $p=0.0343$ ) e con la classificazione nella metà superiore della scala WHO ( $p<1*10^{-4}$ ). La maggior parte dei pazienti ospedalizzati affetti da diabete soffriva anche di ipertensione ( $p<1*10^{-4}$ ) ed era obeso, cioè aveva un BMI superiore o uguale a 30 ( $p=0.00456$ ). Inoltre, le malattie cardiovascolari sono state significativamente associate alla presenza dell'ipertensione ( $p<1*10^{-4}$ ) e quest'ultima è stata a sua volta associata all'obesità ( $p=0.043$ ). Infine, l'obesità è risultata significativamente correlata ai pazienti classificati con una scala WHO di alto livello ( $p=0.00218$ ) e ai soggetti affetti da più di una comorbidità ( $p=0.0443$ ) (Tabella 7).

Per quanto riguarda la casistica totale, le varianti polimorfiche del gene *HSD3B1* non sono risultate significativamente associate con nessun parametro clinico.

#### 4.3 Test di Spearman e Pearson

Per determinare la tipologia di correlazione esistente tra due variabili quantitative, è stato calcolato anche il coefficiente di correlazione di Spearman, indicato come valore rho. Questo coefficiente indica una correlazione lineare tra due parametri qualora il suo valore non è nullo; tale correlazione è diretta per i valori positivi e inversa per i valori negativi.

Il calcolo del valore rho ha riportato una correlazione significativa tra il valore BMI e una maggiore permanenza in cure intense ( $p=0.004838$ ,  $\rho=0.1529229$ ) così come tra l'obesità e l'ospedalizzazione in più giovane età ( $p=0.04779$ ,  $\rho=-0.1072637$ ), nonché una proporzionalità inversa tra il BMI e l'età. La durata della permanenza in cure intense è stata inoltre trovata essere maggiore nei giovani pazienti ( $p=0.006428$ ,  $\rho=-0.1365592$ ).

Il test quadrato di Pearson ha rilevato un'associazione statisticamente significativa tra l'obesità e la presenza di diabete per quanto riguarda l'ammissione alle cure intense ( $p=0.0131$ ) e il sottogruppo di età compreso tra i 14 e i 30 anni ( $p=5.96*10^{-5}$ ).

#### 4.4 Correlazioni tra le variabili rispetto all'ammissione in cure intense

Specifici sottogruppi del polimorfismo del gene *HSD3B1* sono stati associati significativamente al diabete per quanto concerne l'ammissione alle cure intense. Più nel dettaglio, la probabilità di essere ricoverati in terapia intensiva per quanto concerne il sottogruppo di pazienti diabetici P1245C era pari al 47.1% (8/17) mentre per i pazienti P1245C non diabetici era solo del 5.26% (2/38). Al contrario, per gli individui diabetici P1245A, la probabilità di ammissione alle cure intense era pari al 22.5% (9/40) e al 18.64% (22/118) per quelli non affetti da tale comorbidità. Per il sottogruppo degli eterozigoti (P1245A>C) affetti da diabete, la percentuale di

ammissione alle terapie intensive corrispondeva al 20% (9/45) mentre per i pazienti non affetti da questa malattia al 15.6% (22/141). In generale, per quanto concerne i sottogruppi P1245A e P1245A>C, la probabilità di essere ricoverati in cure intense era simile, indipendentemente dalla presenza o meno del diabete. Per il sottogruppo P1245C invece questa probabilità era maggiore di 8.95 volte nei pazienti affetti da questa comorbidità. Tuttavia, per quanto concerne l'entrata alle cure intense, l'unica associazione statisticamente significativa trovata era tra i pazienti P1245C diabetici e i soggetti P1245A non diabetici ( $p=0.00976$ ). Infine, sempre in rapporto all'ammissione in cure intense, gli uomini P1245C erano significativamente più a rischio rispetto alle donne P1245A e P1245A>C ( $p=0.00635$ ).

#### 4.5 Correlazioni tra le variabili rispetto al decesso

Specifici sottogruppi del polimorfismo del gene *HSD3B1* sono stati associati significativamente all'ipertensione per quanto concerne il decesso.

La probabilità di morte nei pazienti ipertesi P1245A>C era del 31.25% (30/96) mentre per i non ipertesi era solo del 12.09% (11/91).

Nei pazienti P1245A la probabilità di decesso in presenza o assenza dell'ipertensione era rispettivamente del 18.29% (15/82) e 21.05% (16/76), mentre nei pazienti ipertesi P1245C questa probabilità era del 20% (6/30) e del 4% (1/25) in assenza di questa comorbidità. In generale nel sottogruppo dei pazienti P1245A non è stata riscontrata differenza per quanto riguarda la probabilità di morte in presenza o meno dell'ipertensione. Al contrario la probabilità di morte era maggiore nei sottogruppi P1245A>C (2.58 volte) e P1245C (5 volte) in presenza dell'ipertensione, se confrontata con l'assenza di questa comorbidità. Complessivamente, la probabilità di morte era statisticamente significativa nei pazienti ipertesi P1245A>C rispetto ai soggetti non ipertesi P1245A ( $p=0.0142$ ). Un andamento simile è stato riscontrato nei pazienti ipertesi P1245C rispetto ai non ipertesi P1245A ( $p=0.0977$ ).

Infine, è stata trovata una correlazione significativa tra la probabilità di decesso e l'età dei pazienti: con l'aumentare di questa, infatti, aumentava il rischio di decesso dei pazienti P1245C rispetto ai P1245A e P1245A>C ( $p=0.03467$ ).

Variabile 1	Variabile 2	Significatività
Sesso	Cure intense	$p = 0.00038$
Sesso	Febbre	$p = 0.0348$
Sesso	Malattie cardiovascolari	$p = 0.0242$
Sesso	WHO bipartita	$p = 0.0349$
Decesso	Cure intense	$p = 0.000000112$
Decesso	Diabete	$p = 0.03$
Decesso	Malattie cardiovascolari	$p = 0.00000306$
Decesso	Ipertensione	$p = 0.0179$
Decesso	Tumore	$p = 0.00315$
Decesso	Comorbidità	$p = 0.00000438$
Decesso	Comorbidità > 1	$p = 0.00000953$
Cure intense	Sintomi respiratori	$p = 0.0339$
Cure intense	Diabete	$p = 0.0343$
Cure intense	Polmonite	$p = 0.015$
Cure intense	WHO bipartita	$p = 6.2 \times 10^{-23}$
Diabete	Ipertensione	$p = 0.0000000504$
Diabete	Comorbidità	$p = 1.01 \times 10^{-11}$
Diabete	Comorbidità > 1	$p = 2.84 \times 10^{-25}$
Diabete	BMI $\geq 30$	$p = 0.00456$
Malattie cardiovascolari	Ipertensione	$p = 0.0000112$
Malattie cardiovascolari	Comorbidità	$p = 1.13 \times 10^{-18}$
Malattie cardiovascolari	Comorbidità > 1	$p = 2.31 \times 10^{-34}$
Ipertensione	Comorbidità	$p = 2.29 \times 10^{-34}$
Ipertensione	Comorbidità > 1	$p = 2.88 \times 10^{-28}$
Ipertensione	BMI $\geq 30$	$p = 0.043$
Malattie respiratorie croniche	Comorbidità	$p = 0.000000828$
Malattie respiratorie croniche	Comorbidità > 1	$p = 2.2 \times 10^{-12}$
Tumore	Comorbidità	$p = 0.00000111$
Tumore	Comorbidità > 1	$p = 0.000000349$
Comorbidità > 1	BMI $\geq 30$	$p = 0.0443$
BMI $\geq 30$	WHO bipartita	$p = 0.00218$
BMI	Permanenza cure intense	$p = 0.0048$ (rho=0.1529229)
BMI	Età	$p = 0.04779$ (rho=-0.1072637)
Permanenza cure intense	Età	$p = 0.006428$ (rho=-0.1365592)
Permanenza cure intense	Giorni ospedalizzazione	$p = 1.93 \times 10^{-11}$ (rho=0.236242)
BMI	Diabete	
<i>rispetto ad entrata in cure intense</i>		$p = 0.0131$
<i>rispetto ad età</i>		$p = 0.0000596$
<b><i>HSD3B1</i> in rapporto a cure intense</b>		
P1245C con diabete	P1245A senza diabete	$p = 0.00976$
P1245C con diabete	P1245A e P1245A>C senza diabete	$p = 0.00707$
Uomini P1245C	Donne P1245A e P1245A>C	$p = 0.00635$
<b><i>HSD3B1</i> in rapporto a decesso</b>		
P1245A>C con ipertensione	P1245A senza ipertensione	$p = 0.0142$
P1245C con aumento età	P1245A e P1245A>C con aumento età	$p = 0.03467$

Tabella 7: Correlazioni significative rilevate con le analisi statistiche. Tabella creata con Microsoft Excel 2019.

## 5. Discussione

Il decorso dell'infezione da SARS-CoV-2, il virus responsabile dell'attuale pandemia di COVID-19, varia a dipendenza delle condizioni di salute dei pazienti, e può comportare uno spettro di sintomi generalmente affini a quelli influenzali che spaziano dall'asintomaticità al decesso.

Tra i diversi fattori correlati a un decorso sfavorevole della malattia vi sono l'età, il sesso maschile, un BMI elevato o la presenza di almeno una comorbidità tra diabete, malattie cardiovascolari, ipertensione, malattie respiratorie croniche o tumori (Guan et al., 2020; Berlin et al., 2020). Tuttavia, la notevole differenza interpersonale nell'andamento della malattia nei pazienti, al netto dei fattori di rischio avverso sopramenzionati ha portato a ipotizzare un'influenza anche da parte dello stato genetico dei pazienti. Infatti, c'è una crescente quantità di prove che indicano che il decorso individuale dell'infezione da SARS-CoV-2, in termini di suscettibilità, gravità e risultati clinici complessivi, possa essere influenzato da fattori genetici (Ovsyannikova et al., 2020; Severe Covid-19 GWAS Group, 2020; COVID-19 Host Genetics Initiative, 2020).

Basandosi su questo concetto è stato deciso di analizzare il ruolo del gene *HSD3B1* come conseguenza del suo coinvolgimento nella sintesi del diidrotestosterone, principale ligando del recettore androgenico. Gli ormoni androgenici sono implicati nella regolazione dell'espressione delle proteine TMPRSS2 e ACE2, fondamentali per l'entrata del virus nelle sue cellule bersaglio (Klein et al., 2020). L'influsso del polimorfismo di questo gene è stato ampiamente studiato nel trattamento dei tumori alla prostata. In particolare, in questi specifici tumori, è stato dimostrato che la variante P1245C riduce drasticamente l'efficacia della terapia di soppressione degli androgeni in quanto la sintesi alternativa alla via gonadica di diidrotestosterone è favorita. Inoltre, questo fattore potrebbe spiegare le differenze ben documentate riscontrate nel decorso della malattia tra maschi e femmine (Shimodaira et al., 2010; Zein et al., 2020; Jin et al., 2020; Rehman et al., 2021).

La frequenza dei polimorfismi *HSD3B1* P1245A, P1245A>C e P1245C riscontrata nella casistica, che comprendeva pazienti ospedalizzati nel Canton Ticino, è risultata simile a quella riportata nella letteratura per quanto riguarda la popolazione caucasica (Ntostis et al., 2012; Khalaf et al., 2020). La rappresentatività dello studio è stata inoltre confermata anche dai vari fattori citati precedentemente correlati a una prognosi sfavorevole dopo l'infezione da SARS-CoV-2 (Grasselli et al., 2020; Richardson et al., 2020; Zhou et al., 2020; Wang et al., 2020; Brar et al., 2020; Gao et al., 2021).

In generale con le analisi bivariate sono state trovate le seguenti correlazioni statisticamente significative.

Il sesso maschile è stato associato allo sviluppo di febbre, all'entrata in cure intense e ad un livello sulla metà superiore della scala WHO; anche altri studi hanno indicato che sebbene il numero di uomini e donne colpiti dall'infezione sia comparabile, si nota una frequenza nettamente più elevata di sintomi gravi negli uomini (Jin et al., 2020).

Nello studio è stata trovata anche una correlazione tra la presenza di tumori e il rischio di decesso per COVID-19. In letteratura è riportata questa associazione, tuttavia la tendenza



spesso non è dimostrata; si indica piuttosto una correlazione tra le terapie mirate a specifici tumori e l'indebolimento del sistema immunitario, che quindi predispone ad uno sviluppo peggiore di ogni tipo di infezione (Brar et al., 2020). Essendo il gruppo di tumori costituito da patologie la cui gravità può essere molto varia, questa correlazione potrebbe anche essere più difficile da constatare.

L'associazione tra il diabete mellito e l'entrata in cure intense oppure il decesso per COVID-19 è stata a sua volta sottolineata da numerosi studi precedenti: è infatti riportato in letteratura che il rischio di decesso raddoppia in presenza di tale comorbidità (Peric & Stulnig, 2020). Inoltre, come dimostrato anche da questa ricerca, il diabete è spesso associato all'obesità, che rappresenta un altro importante fattore di rischio per COVID-19. Le analisi statistiche hanno dimostrato una correlazione tra un BMI elevato e una maggiore permanenza in cure intense, oltre che ad un livello sulla metà superiore della scala WHO. Il rapporto tra l'obesità e la permanenza in cure intense è tra i più riportati in letteratura, nella quale si trova anche una tendenza a maggiore rischio di decesso per COVID-19 con l'aumentare del BMI (Gao et al., 2021).

Questo studio ha dimostrato una proporzionalità inversa tra l'età dei pazienti e la durata della permanenza in cure intense. Tale dato è probabilmente spiegabile dal fatto che i pazienti più giovani usufruiscono maggiormente delle terapie intensive e vanno meno incontro al decesso, il che comporta dunque una permanenza più lunga nel reparto di cure intense.

È inoltre stato trovato un rapporto di proporzionalità inversa tra il BMI e l'età dei pazienti: questo potrebbe indicare che nei più giovani tra i pazienti di questa coorte si sia riscontrato un decorso peggiore per via del fattore di rischio rappresentato dal BMI elevato.

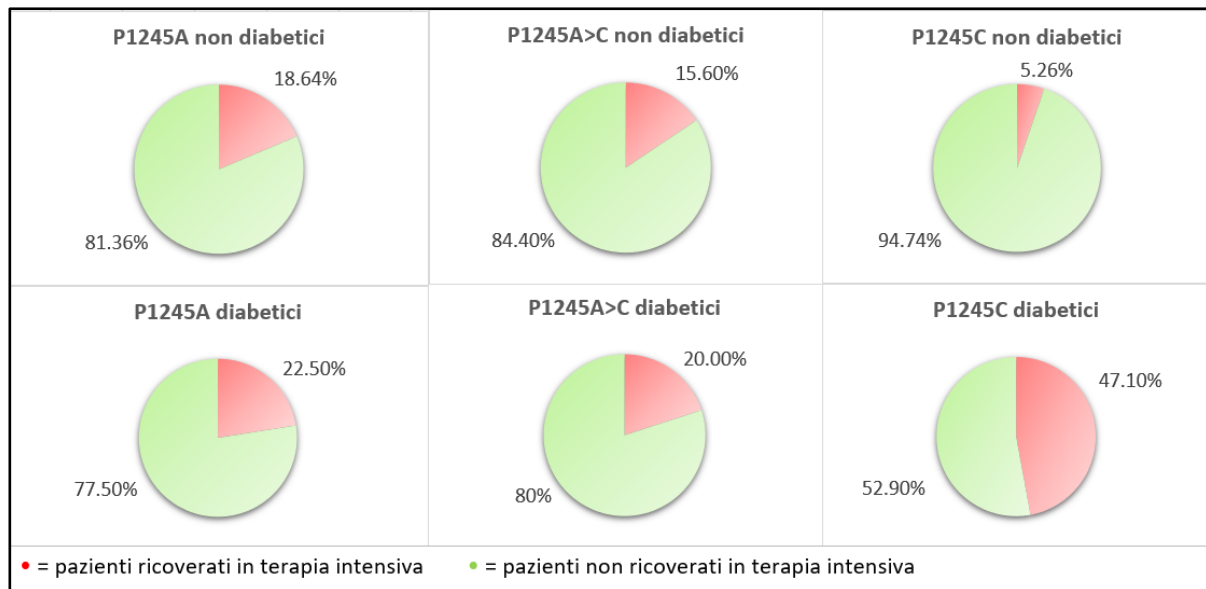
Sono state infine trovate correlazioni significative tra le malattie cardiovascolari e l'ipertensione con risposta il decesso, aspetti dimostrati anche da studi precedenti (Clerkin et al., 2021).

Complessivamente, oltre alle correlazioni puramente cliniche appena riportate, le analisi bivariate non hanno riportato nessuna correlazione statisticamente significativa per quanto riguarda il ruolo delle varianti polimorfiche del gene *HSD3B1* e il decorso dell'infezione da SARS-CoV-2. Quindi, in generale, l'ipotizzata maggiore attivazione della via del recettore degli androgeni dovuta alla variante P1245C sembra non avere un ruolo clinico nell'infezione da SARS-CoV-2. Tuttavia, l'analisi di specifici sottogruppi di pazienti aventi particolari caratteristiche cliniche ha portato a risultati molto interessanti. In particolare, sono state trovate correlazioni significative riguardanti il gene *HSD3B1* in rapporto all'entrata in cure intense e al decesso per COVID-19 per pazienti con specifiche caratteristiche.

I pazienti P1245C affetti da diabete sono risultati significativamente più a rischio dei pazienti P1245A e degli eterozigoti non affetti da tale comorbidità a necessitare delle cure intense. Infatti, tale rischio era 8.95 volte maggiore nei P1245C diabetici rispetto ai P1245C non diabetici. Per quanto concerne i pazienti P1245A e P1245A>C, la presenza della comorbidità non ha aumentato in modo significativo la necessità delle cure intense. Sebbene l'unica correlazione statistica che è stata dimostrata sia quella tra i gruppi P1245C diabetici e P1245A e P1245A>C non diabetici, si osserva come il fenotipo surrenale-permissivo rappresenti un

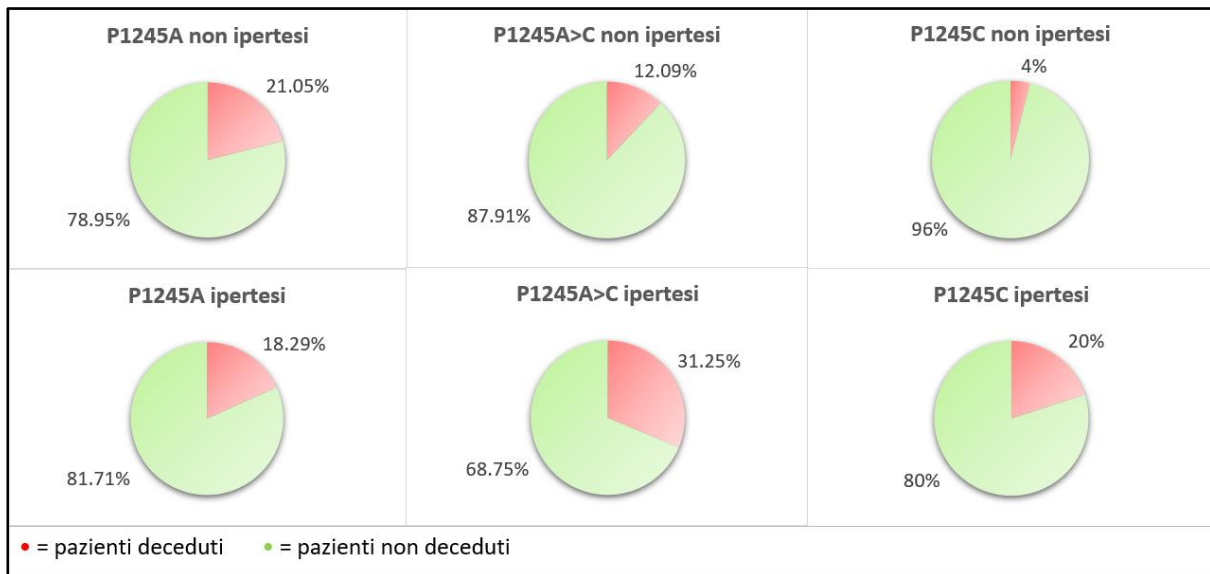
probabile fattore predisponente ad un decorso peggiore della malattia COVID-19 nei pazienti diabetici (Figura 10).

La correlazione tra il genotipo del gene *HSD3B1* e l'entrata in cure intense è stata riscontrata anche negli uomini P1245C rispetto alle donne P1245A e P1245A>C. Ciò indica nuovamente l'implicazione degli ormoni androgeni nello sviluppo dell'infezione virale.



**Figura 10: Rapporto tra pazienti ricoverati o meno in terapia intensiva nei diversi sottogruppi genotipici rispetto alla presenza del diabete.** Si osserva il netto aumento del rischio di essere ricoverati in cure intense per i pazienti P1245C diabetici rispetto ai P1245C non diabetici. Grafici creati con Microsoft Excel 2019.

Per quanto riguarda la probabilità di morte, il polimorfismo del gene *HSD3B1* è stato dimostrato essere implicato nei pazienti ipertesi. Più specificatamente, i soggetti eterozigoti affetti da questa comorbidità sono risultati significativamente più a rischio rispetto ai pazienti P1245A non ipertesi, e il rischio di decesso per gli eterozigoti aumentava nettamente in presenza della comorbidità. Per i pazienti P1245C non è stata trovata una correlazione significativa tramite le analisi statistiche, ma è stata osservata una tendenza e, come negli eterozigoti, si è osservato un sostanziale aumento del rischio di decesso nei pazienti ipertesi rispetto a quelli non ipertesi (Figura 11).



**Figura 11: Rapporto tra pazienti deceduti o meno per COVID-19 nei diversi sottogruppi genotipici rispetto alla presenza dell'ipertensione.** La differenza tra il rischio di decesso per COVID-19 in presenza dell'ipertensione è elevata nei pazienti P1245A>C e P1245C; nei pazienti P1245A, invece, il gene *HSD3B1* non sembrerebbe avere un influsso particolare sul decorso della malattia. Grafici creati con Microsoft Excel 2019.

Infine, l'ultima correlazione significativa trovata nei modelli di questo studio riguarda l'associazione tra il decesso e il fenotipo surrenalico-permissivo in rapporto all'età: il rischio di decesso aumentava con l'età nei pazienti P1245C rispetto ai pazienti P1245A o eterozigoti.

Questi risultati dimostrano che la variante P1245C, e in maniera meno marcata anche la variante eterozigota, può causare in specifici sottogruppi di pazienti affetti da SARS-CoV-2 un maggiore rischio di decorso peggiore o perfino causarne il decesso. Tali pazienti dovrebbero essere dunque indirizzati ad un trattamento farmacologico e ad una sorveglianza più intensi. Dal momento che le analisi bivariate hanno sottolineato anche la rappresentatività della coorte di pazienti analizzata, i risultati potrebbero essere applicati a tutti i pazienti COVID ospedalizzati e non unicamente a quelli specifici alla prima ondata in Ticino.

I risultati sopra menzionati rafforzano il ruolo giocato dai recettori androgeni nell'infezione causata da SARS-CoV-2, suggerendo che la presenza di almeno un allele C influenzi in modo diretto il decorso dell'infezione. Tuttavia, la correlazione tra i recettori androgenici con il diabete e l'ipertensione necessita di ulteriori approfondimenti in quanto non si è attualmente a conoscenza di studi che hanno valutato il ruolo del gene *HSD3B1* in correlazione a queste due comorbidità. Ciò che emerge da questo studio è il fatto che questi risultati potrebbero permettere di identificare i pazienti più soggetti alle cure intense o al decesso in presenza di specifiche comorbidità utilizzando una metodica economica e relativamente veloce.

Tuttavia, vi sono alcune limitazioni. La principale riguarda la dimensione della coorte. Infatti le correlazioni tra le varianti polimorfiche del gene *HSD3B1* e i rispettivi parametri clinicamente rilevanti per l'infezione da SARS-CoV-2 dovrebbero essere condotti su un numero maggiore di pazienti, che però non era disponibile nel Cantone Ticino. Una possibile soluzione

a questo problema sarebbe l'espansione della popolazione coinvolta per questo studio. Questo però implicherebbe l'introduzione di nuove variabili quale l'utilizzo di terapie diverse per trattare i pazienti affetti da COVID-19, in quanto i pazienti che sono stati colpiti dal virus nelle ondate successive hanno ricevuto un diverso trattamento clinico, ad esempio sono stati trattati maggiormente con farmaci corticosteroidi.

I risultati ottenuti con questo progetto sono stati sottomessi dall'Istituto Cantonale di Patologia alla rivista *Frontiers in Medicine* e accettati per la pubblicazione su tale rivista.

## 6. Conclusione

I risultati trovati con questo studio suggeriscono che lo stato genetico dei pazienti può avere un ruolo nell'infezione da SARS-CoV-2. Più precisamente, il polimorfismo del gene *HSD3B1* al nucleotide 1245 potrebbe fungere da potenziale nuovo marcatore in caso di comorbidità specifiche, quali diabete e ipertensione, al fine di prevedere meglio il decorso della malattia e le corrette terapie da somministrare. In particolare, la variante P1245C causa una maggiore predisposizione alla necessità di cure intense per quanto riguarda i pazienti affetti da diabete, e al decesso per quelli affetti da ipertensione oppure di età avanzata.

La dimostrata correlazione tra il fenotipo del gene *HSD3B1* ed un peggiore decorso dell'infezione da SARS-CoV-2 conferma il ruolo degli ormoni androgeni nell'infezione virale. Questi dati offrono dunque un'ulteriore dimostrazione dell'importanza dell'attività del recettore androgenico nello sviluppo della malattia COVID-19. Tuttavia, ulteriori accertamenti su una casistica più ampia sono necessari.

## 7. Ringraziamenti

I miei ringraziamenti vanno al Dr. Milo Frattini, responsabile del Laboratorio di Patologia Molecolare dell'Istituto Cantonale di Patologia, per aver guidato questa ricerca, e alla Dr.ssa Giulia Ramelli per avermi accompagnata durante lo stage in laboratorio e la stesura del lavoro. Ringrazio anche il Prof. Dr. Luca Mazzucchelli, direttore dell'Istituto Cantonale di Patologia, per avermi permesso di svolgere tale stage. Un grande grazie infine ai docenti Riccardo Graber e Giosiana Codoni, che hanno coordinato questo Lavoro di Maturità.

## 8. Bibliografia

- Aronne, L. J. (2002). Classification of Obesity and Assessment of Obesity-Related Health Risks. *Obesity Research*, 105-115.
- Asselta, R., Paraboschi, E. M., Mantovani, A., & Duga, S. (2020). ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. *medRxiv*.
- Baratchian, M., McManus, J. M., Berk, M., Nakamura, F., Mukhopadhyay, S., Xu, W., . . . Sharifi, N. (2020). Sex, androgens and regulation of pulmonary AR, TMPRSS2 and ACE2. *bioRxiv*.
- Berlin, D. G. (2020). Severe COVID-19. *NEJM*, 2451-2460.
- Brar, G., Pinheiro, L. C., Shusterman, M., Swed, B., Reshetnyak, E., Soroka, O., . . . Shah, M. A. (2020). COVID-19 Severity and Outcomes in Patients With Cancer: A Matched Cohort Study. *Journal of Clinical Oncology*.
- Cai, H. (2020). Sex differences and smoking predisposition in patients with COVID-19. *Correspondence*.
- Callis, J. (2014). The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *American Society of Plant Biologists*.
- Clerkin, K. J., Fried, J. A., Raikhelkar, J., Sayer, G., Griffin, J. M., Masoumi, A., . . . Uriel, N. (2020). COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circulation*, 1648-1655.
- COVID-19 Host Genetics Initiative (2020). Host Genetics Initiative, a global initiative to elucidate the role of host genetic factors in susceptibility and severity of the SARS-CoV-2 virus pandemic. *European Journal of Human Genetics*, 715-718.
- Dai, L., & Gao, G. (2021). Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews*, 73-82.
- Gao, M., Piernas, C., Astbury, N. M., Hippisley-Cox, J., O'Rahilly, S., Aveyard, P., & Jebb, S. A. (2021). Associations between body-mass index and COVID-19 severity in 6.9 million people in England: a prospective, community-based, cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*.
- Ghazidadeh, Z., Majd, H., Richter, M., Samuel, R., Zekavat, S. M., Asgharian, H., . . . Fattahi, F. (2020). Androgen Regulates SARS-CoV-2 Receptor Levels and Is Associated with Severe COVID-19 Symptoms in Men. *bioRxiv*.
- Grasselli, G., Zangrillo, A., Zanella, A., Antonelli, M., Cabrini, L., Castelli, A., . . . Presenti, A. (2020). Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA*.
- Guan, W.J., Ni, Z.Y., Hu, Y., Liang, W.H., Ou, C.Q., He, J.X. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *NEJM*, 1708-1720.
- Hasöksüz, M., Kiliç, S., & Saraç, F. (2020). Coronaviruses and SARS-CoV-2. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 549-556.
- Hearn, J. W., AbuAli, G., Reichard, C. A., Reddy, C. A., Magi-Galluzzi, C., Chang, K.-H., . . . Sharifi, N. (2016). HSD3B1 and resistance to androgen-deprivation therapy in prostate cancer: a retrospective, multicohort study. *The Lancet Oncology*, 1435-1444.

- Hearn, J. W., Sweeney, C. J., Almassi, N., Reichard, C. A., Reddy, C. A., Li, H., . . . Sharifi, N. (2020). HSD3B1 Genotype and Clinical Outcomes in Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer. *JAMA Oncology*.
- Hettel, D., & Sharifi, N. (2017). HSD3B1 status as a biomarker of androgen deprivation resistance and implications for prostate cancer. *Nature Reviews*.
- Hou, Y., Zhao, J., Martin, W., Kallianpur, A., Chung, M. K., Jehi, L., . . . Cheng, F. (2020). New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis. *BMC Medicine*.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews*, 141-154.
- Huang, C.-K., Lee, S. O., Chang, E., Pang, H., & Chang, C. (2016). Androgen Receptor (AR) in Cardiovascular Diseases. *J Endocrinol*.
- Jin, J.-M., Bai, P., He, W., Wu, F., Liu, X.-F., Han, D.-M., . . . Jang, J.-K. (2020). Gender Differences in Patients with COVID-19: Focus on Severity and Mortality . *Frontiers in Public Health*.
- Khalaf, D. J., Aragón, M., Annala, M., Lozano, R., Taavitsainen, S., Lorente, D., . . . Castro, E. (2020). HSD3B1(1245A>C) germline variant and clinical outcomes in metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone and enzalutamide: results from two prospective studies. *Annals of Oncology*, 1186-1197.
- Klein, S. L., Dhakal, S., Ursin, R. L., Deshpande, S., Sandberg, K., & Mauvais-Jarvis, F. (2020). Biological sex impacts COVID-19 outcomes. *PLOS Pathogens*.
- Kreuels, B., Kreuzberg, C., Kobbe, R., Ayim-Akonor, M., Apiah-Thompson, P., Thompson, B., . . . May, J. (2010). Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. *Blood*, 4551-4558.
- Kunkel, T. A. (2004). DNA Replication Fidelity. *The Journal of Biological Chemistry*, 16895-16898.
- Landman, A., Feetham, L., & Stuckey, D. (2020). Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. *The Lancet Oncology*, 335-336.
- Lee, L. Y., Cazier, J.-B., Angelis, V., Arnold, R., Bisht, V., Campton, N. A., . . . Middleton, G. (2020). COVID-19 mortality in patients with cancer on chemotherapy or other anticancer treatments: a prospective cohort study. *The Lancet*, 1919-1926.
- Ludwig, S., & Zarbock, A. (2020). Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Basic Science*.
- Marks, M., O'Hara, G., Houlihan, C., Bell, L., Heightman, M., & Hart, N. (2021). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*.
- Matsuyama, S., Nagata, N., Shirato, K., Kawase, M., Takeda, M., & Taguchi, F. (2010). Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2. *Journal of Virology* , 12658-12664.
- Montemiglio, L. C., Di Matteo, A., Savino, C., Illi, B., & Ilari, A. (2020). L'infezione alla luce della biologia strutturale. *Zanichelli SIBBM*.

- National Cancer Institute (2016). New Treatment Target Identified for Key Prostate Cancer Driver. NIH.
- Ntostis, P. P. (2012). Genetic variation in the HSD3B1 gene and recurrent spontaneous abortions. *Journal of Maternal, Fetal and Neonatal Medicine*, 408-410.
- Ovsyannikova, I. H. (2020). The role of host genetics in the immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 susceptibility and severity. *Immunology*, 205-219.
- Peric, S., & Stulnig, T. M. (2020). Diabetes and COVID-19. *Wiener klinische Wochenschrift*, 356-361.
- Regitz-Zagrosek, V., & Kararigas, G. (2017). Mechanistic pathways of sex differences in cardiovascular diseases. *American Physiology Society*.
- Rehman, S. R.-S. (2021). Immunity, Sex Hormones, and Environmental Factors as Determinants of COVID-19 Disparity in Women. *Frontiers of Immunology*.
- Richardson, S. H. (2020). Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*, 2052-2059.
- Sabharwal, N., & Sharifi, N. (2019). HSD3B1 Genotypes Conferring Adrenal-Restrictive and Adrenal-Permissive Phenotypes in Prostate Cancer and Beyond. *Endocrinology*, 2180-2188.
- Salerno, C. (2014). *Appunti di Biochimica Clinica*. Tratto da Università Roma: [https://elearning.uniroma1.it/pluginfile.php/129558/mod\\_resource/content/3/undefined/Completo/a10/testo.HTM](https://elearning.uniroma1.it/pluginfile.php/129558/mod_resource/content/3/undefined/Completo/a10/testo.HTM)
- Severe Covid-19 GWAS Group: Ellinghaus, D. D. (2020). Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *NEJM*, 1522-1534.
- Sharifi, N., & Ryan, C. J. (2020). Androgen Hazards with COVID-19. *Bioscientifica*.
- Sharifi, N., Gulley, J. L., & Dahut, W. L. (2005). Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *JAMA*, 238-244.
- Shimodaira, M. N. (2010). Association of HSD3B1 and HSD3B2 gene polymorphisms with essential hypertension, aldosterone level, and left ventricular structure. *European Journal of Endocrinology*, 671-680.
- Singhal, T. (2020). A review of Coronavirus Disease-19 (COVID-19). *The Indian Journal of Pediatrics*, 281-286.
- Subbarao, K., & Mahanty, S. (2020). Respiratory Virus Infections: Understanding COVID-19. *CellPress*, 905-909.
- Swissmedic. Aggiornato al 25 novembre 2021. Tratto da Swissmedic: <https://www.swissmedic.ch/swissmedic>
- Tan, E., Li, J., Xu, E., Melcher, K., & Yong, E.-I. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Nature*, 3-23.
- Tu, Y.-F., Chien, C.-S., Yarmishyn, A. A., Lin, Y.-Y., Luo, Y.-H., Lin, Y.-T., . . . Chiou, S.-H. (2020). A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *International Journal of Medical Sciences*.

- UFSP. Aggiornato al 25 novembre 2021. Tratto da Ufficio Federale della sanità pubblica: <https://www.covid19.admin.ch>
- Vickman, R. E., Franco, O. E., Moline, D. C., Griend, D. J., Thumbikat, P., & Hayward, S. W. (2020). The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian Journal of Urology*, 191-202.
- Wang, B., Li, R., Lu, Z., & Huang, Y. (2020). Does comorbidity increase the risk of COVID-19: evidence from meta-analysis. *Aging*, 6049-6057.
- World Health Organisation (2020). COVID-19 Therapeutic Trial Synopsis. R&D Blueprint.
- Youngsoo Kim, S. H.-S., & Steitz, T. A. (1995). Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nature*, 612-616.
- Zein, J., Gaston, B., Bazeley, P., DeBoer, M. D., Jr., R. P., Bleecker, E. R., . . . Sharifi, N. (2019). HSD3B1 genotype identifies glucocorticoid responsiveness in severe asthma. *PNAS*, 2187-2193.
- Zhang, J.-j., Dong, X., Cao, Y.-y., Yuan, Y.-d., Yang, Y.-b., Yan, Y.-q., . . . Gao, Y.-d. (2020). Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*, 1730-1741.
- Zhang, Y.-Z., & Holmes, E. C. (2020). A Genomic Perspective on the Origin and Emerge of Sars-CoV-2. *Cell*, 223-227.
- Zhou, F. Y. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 1054-1062.