

## RILEVANZA DEL SESSO NELLA MALATTIA DA COVID-19: QUANDO UN CROMOSOMA IN PIÙ FA LA DIFFERENZA!

Nota del s.c. LIDIA LARIZZA (\*)

(Adunanza del 4 febbraio 2021)

SUNTO. – Meta-analisi di dati epidemiologici globalizzati di pazienti SARS-CoV-2 positivi ricoverati in unità di terapia intensiva nel 2020 hanno indicato il sesso maschile tra i fattori di rischio di evoluzione grave, talvolta fatale della malattia, come già segnalato da precedenti infezioni da coronavirus. L'inattivazione del cromosoma X (XCI), un meccanismo epigenetico che nelle cellule somatiche femminili rende uguale la dose dei geni X-linked tra i due sessi e i vantaggi per le donne del mosaicismo dei geni immuno-relati presenti in alta densità sul cromosoma X e dell'espressione aumentata rispetto al maschio dei geni che sfuggono all'inattivazione, hanno portato ad un crescente riconoscimento della biologia unica del cromosoma X per spiegare la più robusta risposta immunitaria delle femmine. Nell'ambito di ricerche volte a dimostrare il contributo di geni X-linked coinvolti nella risposta immunitaria a differenze sesso-specifiche nella malattia da COVID-19 è stata quantificata a livello di singole cellule plasmacitoidi dendritiche femminili l'espressione di *TLR7*, un gene chiave dell'immunità innata che codifica un recettore della famiglia Toll-like, "sensore" dell'RNA virale endosomale di SARS-CoV-2. Lo studio ha confermato l'"escape" di *TLR7* all'inattivazione che consente nelle donne aumentati livelli di mRNA di *TLR7* e di interferoni, potenti antivirali, da parte delle cellule dendritiche che ne sono tra i maggiori produttori. L'importanza dell'integrità della via segnaletica attivata da TLR7 è dimostrata da uno studio olandese di due coppie di fratelli (età media 26 anni, nessuna preesistente condizione medica) da famiglie non relate, ricoverati per insufficienza respiratoria da malattia COVID-19 grave in unità di terapia intensiva, uno dei quali poi deceduto per shock settico. Il sequenziamento dell'intero esoma dei pazienti ha identificato varianti patogenetiche "da perdita di funzione" del gene *TLR7* e studi funzionali sulle loro cellule mononucleate del sangue periferico stimolate in vitro con un agonista di TLR7 hanno dimostrato significativa diminu-

---

(\*) IRCSS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italy.  
E-mail: l.larizza@auxologico.it

zione dei trascritti *TLR7*-specifici e di quelli di diversi geni per gli interferoni, rispetto ai genitori e ai controlli. Benché le rare mutazioni di *TLR7* non possano giustificare il sex bias dei maschi per la malattia grave da COVID-19, la loro identificazione contribuisce alla comprensione della sua patogenesi indicando il recettore Toll-like 7 come nodo cruciale per il riconoscimento di SARS-CoV-2 e l'inizio della risposta immunitaria volta a neutralizzare il virus e a prevenire lo sviluppo dell'infezione.

\*\*\*

ABSTRACT. – Meta-analysis of epidemiological world-wide reports of SARS-CoV-2 patients requiring mechanical ventilation in intensive care units highlighted the male sex as a risk factor for severe, often fatal evolution of COVID-19 disease, as signaled by previous coronavirus infections. X chromosome inactivation (XCI), an epigenetic mechanism used by female somatic cells to equalize the dosage of X-linked genes between the sexes and the female advantage with mosaicism of the numerous immune-related genes and the increased expression of those escaping XCI determined a growing recognition of the unique biology of the X chromosome to account for females more robust immune response. In the wake of studies aimed at establishing the contribution of immune-regulatory X-linked genes to sex-specific differences of COVID-19 disease, the expression of *TLR7*, a gene of innate immune response encoding a member of Toll-like family receptors sensing the SARS-CoV-2 endosomal RNA, has been quantified in human female plasmacytoid dendritic cells which are high producers of interferons, acting as powerful viral inhibitors. The study confirmed that *TLR7* escapes XCI promoting higher *TLR7* mRNA and higher interferon mRNA at the single-cell level. The relevance of *TLR7* signaling has been highlighted by a Dutch study exploring the presence of genetic variants among young men with severe COVID-19 which identified pathogenic *TLR7* variants in two pairs of brothers (mean age 26 years) without medical history admitted to intensive care units due to SARS-CoV-2 acute respiratory syndrome, one of whom deceased due to septic shock. Whole exome sequencing of the patients identified “loss of function variants” of the X-chromosomal *TLR7* and functional studies on their peripheral blood mononucleate cells after in vitro stimulation with a *TLR7* agonist showed significant reduction of *TLR7*-specific mRNA and decreased mRNA expression of various interferon type I genes as compared to family members and controls. While rare mutations in *TLR7* are unlikely to be a major driver of severe COVID-19 disease, their identification begins to unravel the molecular underpinning of COVID-19 infection highlighting *TLR7* receptor as a critical node in recognizing SARS-CoV-2 and initiating an early immune response to clear the virus and prevent the development of COVID-19.

## PREMESSA

Il tema oggetto di questa nota, rilevante con l'emergere della medicina personalizzata, riguarda l'identificazione di meccanismi genetici, legati alla biologia unica del cromosoma X, che possono contribuire alle differenze tra maschi e femmine nella risposta immunitaria al nuovo  $\beta$  coronavirus designato SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) e al decorso clinico della malattia respiratoria indicata

come malattia da COVID-19 che rappresenta la sua più frequente complicazione letale. Il sesso biologico ha componenti ormonali e genetiche: gli ormoni influiscono nel periodo della vita riproduttiva, i determinanti genetici, nel corso di tutta la vita. Differenze tra i sessi si possono manifestare nella suscettibilità all'infezione, nel controllo del virus da parte del sistema dell'immunità innata e adattativa e nell'equilibrio tra infiammazione e riparazione tissutale nella risoluzione dell'infezione.

#### 1. AUMENTATA PROBABILITÀ DI DECORSO SFAVOREVOLE DELLA MALATTIA DA COVID 19 E SESSO MASCHILE: DATI EPIDEMIOLOGICI

La relazione tra sesso maschile e aumentata probabilità di evoluzione sfavorevole della malattia da COVID-19 è emersa dalle analisi epidemiologiche nel primo semestre 2020, in linea con quanto osservato per le infezioni da coronavirus risultanti nella MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome) nel 2002 [1] e nella SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome) nel 2012-13 [2]. Uno studio inglese di meta-analisi dei dati di oltre un milione di pazienti COVID-19 accessibili alla fine del primo semestre 2020 attraverso report forniti disaggregati per il sesso di 90 diverse nazioni o stati US, ha evidenziato che, benché maschi e femmine abbiano rischio equivalente di infezione, i maschi hanno rispetto alle femmine probabilità di ricorso a terapia intensiva di quasi tre volte e più alta probabilità di morte [3]. Lo stesso messaggio emerge da uno studio americano che analizzando dati da 38 nazioni stima una CFR (Case Fatality Rate) media nei maschi 1.7 quella delle femmine (*Fig. 1A*) e stratificando per 12 paesi la CFR per fasce di età, conferma che la mortalità cresce in entrambi i sessi con l'età, ma sopra i 30 anni i maschi hanno una CFR significativamente maggiore delle femmine (*Fig. 1B*) [4]. Lo studio dei campioni serici di una piccola coorte di pazienti COVID-19 ha identificato differenze sesso-specifiche nelle popolazioni di cellule dell'immunità e nei livelli di citochine del siero correlate alla gravità della malattia [5, 6]. Ulteriori analisi retrospettive di pazienti COVID-19 indicano come predittivi di decorso avverso marker di laboratorio relativi allo stato infiammatorio, quali la proteina C reattiva (CRP), i cui valori sono più elevati nei maschi che nelle femmine [7]. Benché la comprensione dei patomeccanismi innescati dal dimorfismo sessuale rimane ancora frammentaria, il bias per il sesso maschile appare un fenomeno esteso a tutto il mondo e si presenta come variabile che può influenzare il decorso cli-

nico e la mortalità e fornire informazioni per la gestione del paziente traducibili in strumenti terapeutici mirati. Strategie di trattamento sesso-specifiche sono applicate raramente nella routine clinica delle patologie umane al di fuori del settore oncologico. Il contributo di determinanti genetici che agiscono in concerto con fattori ormonali e la dinamica con cui influenzano differenze sesso-specifiche nel decorso della malattia da COVID-19 sono temi di intensa investigazione e la loro comprensione potrà guidare gli interventi di sanità pubblica e biomedici.

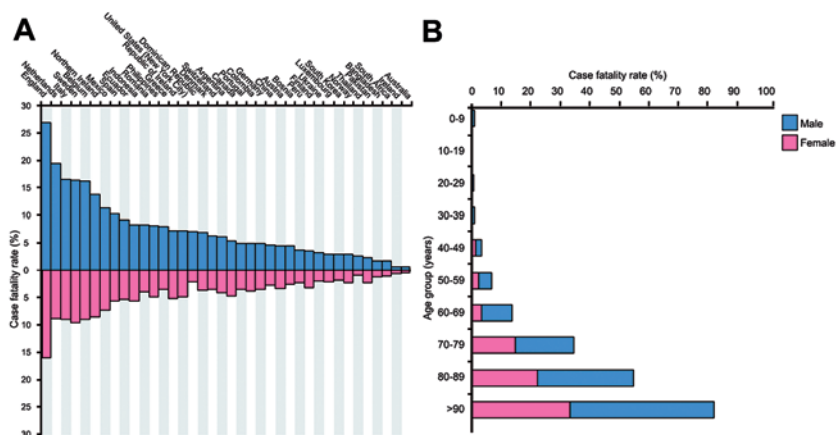
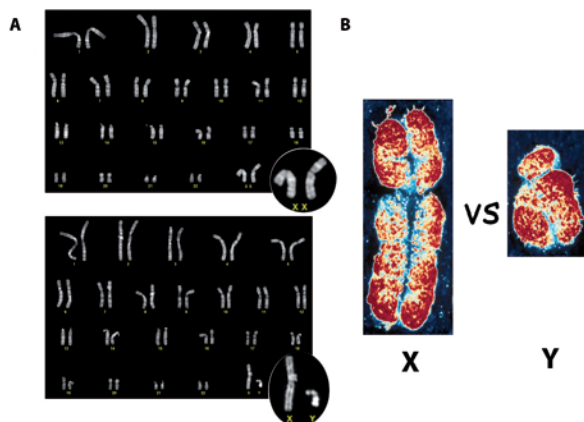


Fig. 1. Probabilità di morte (CFR=Case Fatality Rate) da COVID-19 in base al sesso. A) in 38 paesi; B) stratificazione della CFR in base all'età in 12 dei paesi considerati. La CFR, calcolata come numero di morti diviso il numero totale di casi per ciascun sesso moltiplicato per 100 è più elevata per i maschi in 37 nazioni (A). La CFR aumenta per entrambi i sessi con l'età, ma sopra i 30 anni i maschi hanno una CFR significativamente maggiore delle femmine (B). Modificata da: Scully *et al.*, *Nat Rev Imm* 2020,20 (7): 442 [4].

## 2. I CROMOSOMI DEL SESSO NELL'UOMO E L'INATTIVAZIONE DEL CROMOSOMA X NELLE FEMMINE

L'assetto cromosomico di maschi e femmine è paragonabile per le 22 coppie di cromosomi, denominate autosomi e differisce nella coppia dei cromosomi del sesso, XX nella femmina e XY nel maschio (Fig. 2A). I cromosomi X e Y si sono evoluti da una coppia ancestrale di cromosomi simili agli autosomi circa 300 milioni di anni fa. La ricombinazione durante la gametogenesi maschile è stata soppressa nel tempo dando luogo a enorme divergenza tra X ed Y tranne che per le regioni omologhe alle loro estremità terminali denominate PAR1 e PAR2 (Pseudo Autosomal Regions) che consentono l'appaiamento tra X ed Y nella sper-

matogenesi e la loro corretta segregazione nei gameti. La femmina è il sesso omogametico e alla meiosi produce cellule uovo tutte con il cromosoma X, mentre il maschio matura 50% di spermatozoi con l'X e 50% con l'Y: il meccanismo XY della determinazione del sesso garantisce attraverso l'assortimento random dei gameti alla fecondazione il mantenimento del rapporto sessi 1:1 nel corso delle generazioni.



*Fig. 2. I cromosomi del sesso.* A) Cariotipo in bande Q (QFQ) umano normale femminile (in alto) e maschile (in basso) costituito da 22 coppie di cromosomi omologhi uguali nei due sessi (autosomi) e dalla coppia di cromosomi del sesso, XX nella femmina e XY nel maschio (negli ovali). B) i cromosomi X ed Y in un'immagine di microscopia elettronica a scansione (SEM) visualizzano le marcate differenze di dimensione fisica: 156 Mb (milioni di basi) dell'X contro 59 Mb dell'Y a cui corrisponde un alto contenuto genico per l'X (> 1500 geni) e solo circa 60 geni per l'Y.

I cromosomi X e Y sono drammaticamente diversi (*Fig. 2B*): l'X è un cromosoma di media dimensione: ha una lunghezza fisica di 156 milioni di basi o Megabasi (Mb) e rappresenta circa il 5% del DNA cellulare totale: contiene 852 geni che codificano proteine, di cui quasi un centinaio relati alle funzioni immunitarie, e 665 geni che non hanno istruzioni per codificare proteine, ma sono trascritti in RNA. Da notare che sul cromosoma X mappa il 10% dei geni di regolazione di tutto il genoma, che comprendono geni per lncRNA (long non coding RNA) e miRNA (micro RNA), molti dei quali implicati nel controllo della risposta immunitaria. Il cromosoma Y ha una lunghezza fisica di 59 Mb, rappresenta il 2% del DNA totale ed è povero di geni: ne contiene meno di 100, molti esclusivi del cromosoma Y come SRY (Sex determining Region of the Y), primo determinante della mascolinità e geni relati alla spermatogenesi, e mantie-

ne funzionali solo 20 dei circa 600 geni che un tempo condivideva con il cromosoma X. Le differenze tra X ed Y, legate ai meccanismi di determinazione del sesso nei mammiferi, si sono evolute nel corso di molti milioni di anni. L'ineguaglianza genetica tra X e Y, che determinerebbe espressione dei geni del cromosoma X in doppia dose nella femmina rispetto al maschio, viene compensata da un meccanismo che ne assicura livelli equivalenti di espressione tra i due sessi attraverso l'inattivazione di uno dei due cromosoma X della femmina (*X Chromosome Inactivation* o *XCI*) nei mammiferi (uomo compreso): si tratta di un meccanismo epigenetico che continua ad affascinare generazioni di genetisti da quando nel 1961 la ricercatrice inglese Mary Lyon l'ha ipotizzato basandosi su studi di femmine di topo con mantello a chiazze, eterozigoti per un gene mutante del cromosoma X che controlla il colore del pelo [8].

Durante l'embriogenesi precoce, nell'uomo allo stadio di blastocisti tardiva, tra l'impianto dell'uovo fecondato e il termine del primo mese di gravidanza (quando l'embrione è costituito da circa 5.000 cellule) uno dei due cromosomi X di un embrione femmina scelto a caso, paterno ( $X_p$ ) o materno ( $X_m$ ) è inattivato e tutte le cellule discendenti si conformano alla decisione presa dalla cellula progenitrice. La femmina è quindi un mosaico di 2 popolazioni cellulari per l'X inattivo: circa il 50% di cellule inattivano  $X_p$  e circa il 50%  $X_m$  (*Fig. 3A*) [9]. Quando ci sono alleli diversi (forme alternative dello stesso gene che occupano posizioni corrispondenti sui cromosomi omologhi) ovvero le femmine sono eterozigoti per geni legati all'X (X-linked), nel caso sia presente una variante deleteria (mutazione) o svantaggiosa/vantaggiosa (polimorfismo) nelle portatrici l'effetto di tale variante sarà manifesto solo in metà anziché in tutte le cellule, a differenza del maschio, che ha un solo cromosoma X, in cui l'effetto si manifesterà in tutte le cellule. Questa "diversità fenotipica" conferisce un primo vantaggio delle femmine rispetto ai maschi che ha rilevanza nella risposta immunitaria, considerando che un alto numero di geni immuno-relati mappano sul cromosoma X umano. Una diversità aggiuntiva può verificarsi per inattivazione preferenziale o "skewed": il processo per cui uno dei due cromosomi X è preferenzialmente silenziato in >75% delle cellule per motivi stocastici o per selezione contro la popolazione cellulare che ha attivo un cromosoma X con una variante che conferisce svantaggio proliferativo. L'inattivazione non random può dare vantaggio alle donne eterozigoti perché può portare alla selezione di cellule "wild-type" rispetto alle cellule mutanti. Il meccanismo di inattivazione o silenziamento del secondo cromosoma X della femmina (con l'eccezione delle regioni PAR1 e

PAR2 che sfuggono all'inattivazione) compensa la dose genica dell'X tra i due sessi: la femmina 46 XX mantiene un cromosoma X attivo come il maschio che ne ha solo uno e silenzia l'altro cromosoma X, che si evidenzia all'interfase come masserella eterocromatica alla periferia del nucleo, il cosiddetto corpo di Barr (dal nome del suo scopritore nel 1949). Nel caso di aneuploidie del cromosoma X è mantenuto attivo sempre e solo un cromosoma X e tutti gli X in eccesso sono inattivati e compaiono come corpi di Barr in interfase (regola dell'n-1), il che rende conto delle relativamente ridotte conseguenze fenotipiche di queste aneuploidie rispetto a quelle che coinvolgono autosomi (Fig. 3B).

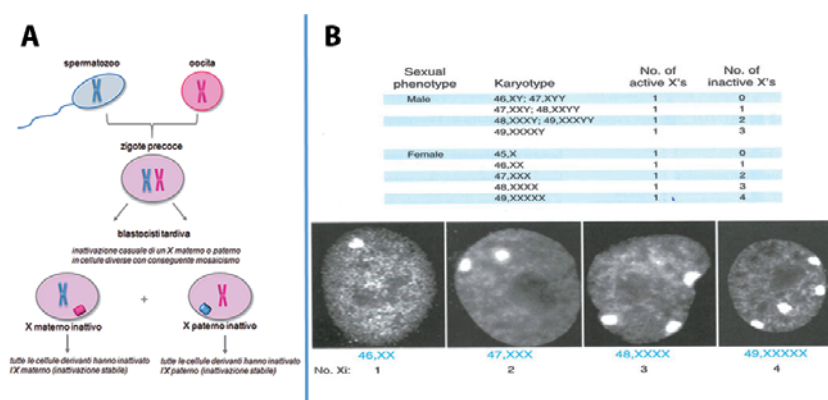


Fig. 3. *Ipotesi di Mary Lyon (1961) sull'inattivazione del cromosoma X.* A) durante l'embriogenesi precoce uno dei cromosomi X a caso (paterno o materno) di una femmina è inattivato (eterocromatizzato) e tutte le cellule discendenti si conformano alla decisione presa, configurando la femmina come mosaico di due popolazioni cellulari per l'X inattivo (Modificata da: Strachan T, Read A, *Genetica Molecolare Umana*, Zanichelli, 2016, pag. 418) [9]. B) La femmina normale 46 XX mantiene un cromosoma X attivo come il maschio che ne ha solo uno e silenzia l'altro cromosoma X che compare come masserella eterocromatica alla periferia del nucleo (corpo di Barr dal nome dello scopritore). Le patologie risultanti da aneuploidie del cromosoma X (45 XO e X extranumerari in maschi e femmine) hanno relativamente ridotte conseguenze fenotipiche perché l'X mancante è soggetto ad inattivazione e gli X in eccesso sono inattivati secondo la regola dell' 'n-1 (inattivati tutti i cromosomi X meno uno).

Il meccanismo molecolare dell'inattivazione del cromosoma X (XCI) benchè intensamente investigato ha ancora punti enigmatici ma una sua trattazione è al di là dello scopo di questa nota. Riinvio quindi ad una review esaustiva [10] e mi limito qui a menzionare il gene "master" di questo processo epigenetico, XIST (X Inactive Specific Transcript) localizzato nella regione di 200 Kb del cromosoma X definita XIC (X Inactivation

Center) (Fig. 4A) [11]. XIST é espresso solo dal cromosoma X che verrà inattivato, avvia la fase iniziale di “conta” nelle cellule dell’embrione XX del numero di cromosomi X rispetto alla ploidia, effettua la “scelta” di quale dei due cromosomi X sia da inattivare e opera la “diffusione” in cis dello stato di inattivazione dal sito in cui è espresso mediante rivestimento o “coating” del cromosoma X che diverrà inattivo reclutando complessi repressivi che determinano ipoacetilazione degli istoni, introduzione di varianti istoniche, metilazione dei promotori genici con stabilizzazione della struttura eterocromatica (Fig. 4A). Centinaia di loci genici strettamente associati sono simultaneamente e stabilmente silenziati e tale condizione è mantenuta attraverso le divisioni mitotiche.

L’ipotesi di Mary Lyon ha aperto un campo paradigmatico per l’epigenetica all’intersezione della biologia dello sviluppo e la genetica che nel tempo ha mostrato sempre più rilevanza medica (gestione del paziente) e terapeutica.

### 3. GENI DEL CROMOSOMA X CHE SFUGGONO ALL’INATTIVAZIONE: GENI IMMUNO-RELATI E DIVERSA SUSCETTIBILITÀ DI MASCHI E FEMMINE A MALATTIE INFETTIVE

L’inattivazione del cromosoma X non è né “*uniforme*” né “*completa*” ed è noto da quasi due decenni [12] che alcuni geni sfuggono a XCI e risultano espressi sia dall’X attivo che da quello inattivo, con un livello  $\Rightarrow 10\%$  rispetto all’X attivo: questi geni presentano quindi livelli di espressione più alti, anche se non doppi, nelle femmine rispetto ai maschi. Recentemente un importante studio che ha utilizzato approcci innovativi di analisi di espressione (RNA Seq) su cellule singole e molteplici tessuti, integrati da analisi genomiche ha rivelato che circa 1/3 dei geni X-linked continuano ad essere espressi dall’X inattivo: di questi la metà sfuggono all’inattivazione in tutti gli individui e tessuti analizzati (“*escapees regolari*”), mentre l’altra metà sono riattivati in modo variabile tra individui e tipi cellulari (“*escapees facoltativi*”) [13] (Fig. 4B). Nell’uomo i geni che sfuggono all’inattivazione sono raggruppati in domini che possono raggiungere dimensioni di megabasi e sono preferenzialmente localizzati sul braccio corto del cromosoma X perché questa regione è quella che più recentemente nel corso dell’evoluzione si è diversificata dall’Y [12]. Se i geni che sfuggono all’inattivazione sono implicati nella suscettibilità e/o decorso clinico di malattie, la variabilità tra individui e tessuti nel livello di espressione potrà influenzare la prevalenza sesso-specifica della patologia.



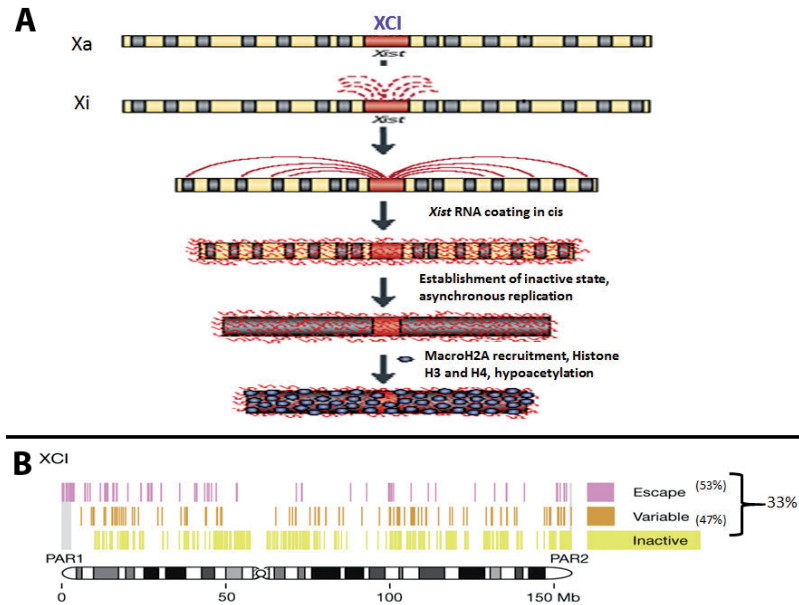


Fig. 4. Il processo epigenetico dell'inattivazione del cromosoma X. A) Il gene master del processo, *XIST* (X Inactive Specific Transcript), localizzato in una regione denominata centro di inattivazione dell'X (XIC) è trascritto sull'X che diventerà inattivo in un lungo RNA non codificante (lncRNA) che effettua un "coating" in cis del cromosoma e recluta, in cooperazione con altri lncRNA, complessi repressivi che introducono modificazioni a livello degli istoni e dei promotori genici che ne determinano lo stato inattivo. Questo è caratterizzato da replicazione asincrona rispetto al restante DNA genomico e dal silenziamento di centinaia di loci genici strettamente associati (Modificata da Avner P, Heard E, *Nat Rev Genet.* 2001, 2(1):59-67 [11]). B) *Inattivazione incompleta del cromosoma X*: idiogramma del cromosoma X umano che a parte le regioni PAR1 e PAR2 dovrebbe essere tutto inattivato, come indicato dalle barrette gialle. In realtà circa 1/3 dei geni sfugge all'inattivazione: l' "escape" è completo tra individui e tessuti per la metà dei geni (barrette porpora), mentre è variabile tra individui e tessuti nella restante metà dei geni (barrette ocra). Dati estrapolati da Tukiainen T et al., *Nature* 2017, 550:244-248. [13]

Per quanto riguarda le infezioni è noto da tempo che ci sono diversità tra i sessi nella risposta immunitaria al patogeno e nella riparazione tissutale, che influenzano l'evoluzione della patologia. Ad es. i maschi sono più suscettibili alle infezioni acute delle femmine [14]. Inoltre la prevalenza dell'epatite A e della tubercolosi è notevolmente più elevata negli uomini e la carica virale è più elevata nei pazienti maschi con il virus dell'epatite C e dell'immunodeficienza (HIV). Al contrario le donne effettuano una clearance più veloce dei patogeni, montano una risposta

contro i vaccini dell'influenza stagionale due volte più efficace degli uomini, ma proprio per la loro risposta immunitaria più robusta sono anche più suscettibili a malattie autoimmuni [15, 16]. I meccanismi attraverso cui SARS-CoV-2 provoca una malattia più grave nei maschi che nelle femmine rimangono da decifrare.

Per tutte le infezioni la risposta da parte dell'ospite è allestita da cellule dell'immunità innata e adattativa che agiscono in sinergia ad una serie di mediatori chimici del siero (*Appendice A*) (Fig. 5).

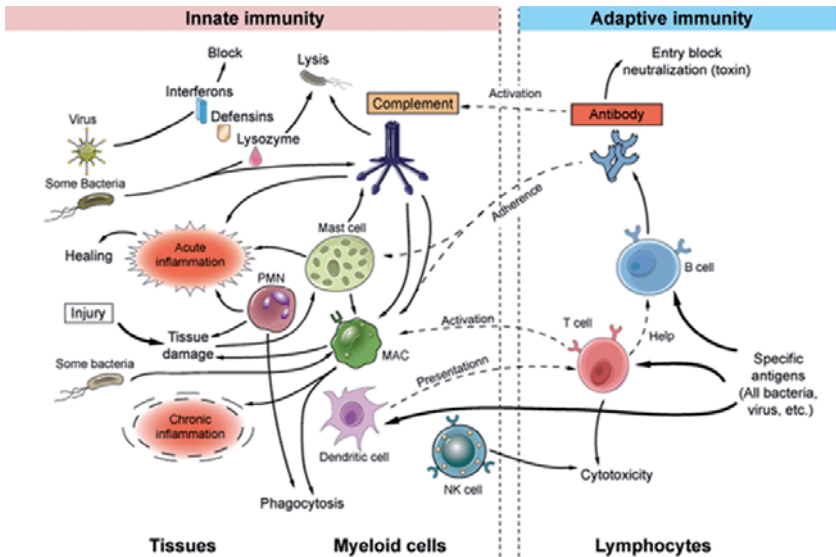


Fig. 5. *Cellule dell'immunità innata e adattativa.* A) Cellule e proteine del siero che intervengono nella *risposta immunitaria innata* verso un patogeno utilizzando meccanismi di difesa ad azione immediata presenti indipendentemente dall'agente estraneo e con specificità limitata a strutture comuni a gruppi di patogeni. Neutrofilo, macrofagi, mastcellule, cellule Natural Killer e cellule plasmacitoidi dendriche in sinergismo a mediatori serici dell'infiammazione, lisano le cellule infettate e fagocitano le particelle infettive. B) Le cellule dell'*immunità adattativa o acquisita*, linfociti T e B reagiscono ad un'ampia varietà di microbi e sostanze estranee riconoscendole con specificità e "memoria", ovvero la capacità di rispondere a ripetute esposizioni dello stesso "antigene" mediante gli anticorpi prodotti. La maggior parte degli effetti dell'immunità adattativa sono esercitati attraverso l'interazione degli anticorpi con il complemento e i fagociti dell'immunità innata, e delle cellule T con i macrofagi (linee tratteggiate) (vedi *Appendice A*).

Benché esista un dimorfismo dei cromosomi sessuali uomini e donne devono rispondere alle stesse sfide immunologiche. L'infiammazione viene considerata un'arma a doppio taglio: perché da un

lato è richiesta per il controllo e l'eliminazione di patogeni esterni, dall'altro una risposta infiammatoria eccessiva può portare a disfunzione d'organo o shock settico. Un'omeostasi immunologica ottimale si ha quando il patogeno è rimosso con alta efficienza e si evita il danno tissutale dell'ospite. Questa bilancia immunologica è diversa tra maschi e femmine. Il dimorfismo sessuale nella risposta immunitaria è presente anche negli individui sani e si evidenzia sia nei numeri di popolazioni di cellule immuno-relate che nelle concentrazioni di citochine del siero [17]. Le donne hanno un numero maggiore di cellule B, e di neutrofili, livelli serici più elevati di IgM, anticorpi che non hanno ancora effettuato il cosiddetto cambio di classe (switch isotipico), e un numero maggiore di cellule T CD4+. Gli uomini hanno numeri più alti di cellule T CD8+ e Natural Killer (*Fig. 6A,B*). Vi sono differenze tra i sessi nella produzione di citochine, con maggiori livelli di interferon di tipo 1 (IFN $\alpha$ ) e di IL-10 nelle donne (*Fig. 6B*). Determinanti genetici contribuiscono alle differenze tra i sessi nella risposta immunitaria attivata dalla presenza di un patogeno. Nell'uomo le cellule della risposta immunitaria hanno un solo allele X-linked che può essere adeguato, ipo- o iper-responsivo in una certa condizione patologica. Nelle femmine che hanno due cromosomi X, nel caso di geni polimorfici nella popolazione, le cellule dell'immunità innata possono differire negli alleli parentali X-linked il che consente diversa capacità di regolazione ed attivazione. Inoltre esistono geni importanti per la risposta immunitaria che sfuggono alla XCI e sono espressi nelle femmine sia dall'X attivo, che da quello inattivo e geni che possono essere riattivati in cellule che partecipano alla risposta immunitaria ("escapees facoltativi") come dimostrato di recente per l'X inattivo delle cellule B e T "naive" (non ancora entrate in contatto con antigeni) [18]. Ci sono crescenti dimostrazioni che i linfociti umani e murini non mantengono l'inattivazione del cromosoma X con la stessa fedeltà di altre cellule somatiche suggerendo che si sono evoluti meccanismi che portano a rilassare il silenziamento dell'X inattivo per aumentare l'espressione di geni implicati nella risposta immunitaria per combattere le infezioni [19]. Se geni X-linked possono essere espressi in modo variabile su entrambi gli alleli nelle cellule dell'immunità, si avrà un'augmentata diversità della risposta immune. Tutto ciò fornisce un sistema più flessibile che si adatta meglio alla pato-fisiologia dinamica durante la risposta infiammatoria e spiega la più robusta risposta immunitaria delle femmine e la loro maggiore predisposizione a sviluppare malattie autoimmuni [15, 16]. Ai determinanti genetici si aggiungono nel corso della vita riproduttiva gli ormoni, estrogeni e testosterone che influenzano la risposta immunitaria innata e adattativa in presenza di patogeni sia attraverso

vie segnalatiche mediate da recettori presenti su cellule immunocompetenti che attraverso la presenza di elementi di risposta nei promotori di numerosi geni immuno-relati (Fig. 6C). Il profilo di espressione differenziale tra maschi e femmine contribuisce al bias per il sesso maschile evidenziato da studi epidemiologici in molte malattie infettive causate da agenti virali quali l'epatite A e B, l'Epstein Bar, il West Nile virus e i coronavirus della SARS e della MERS [17].

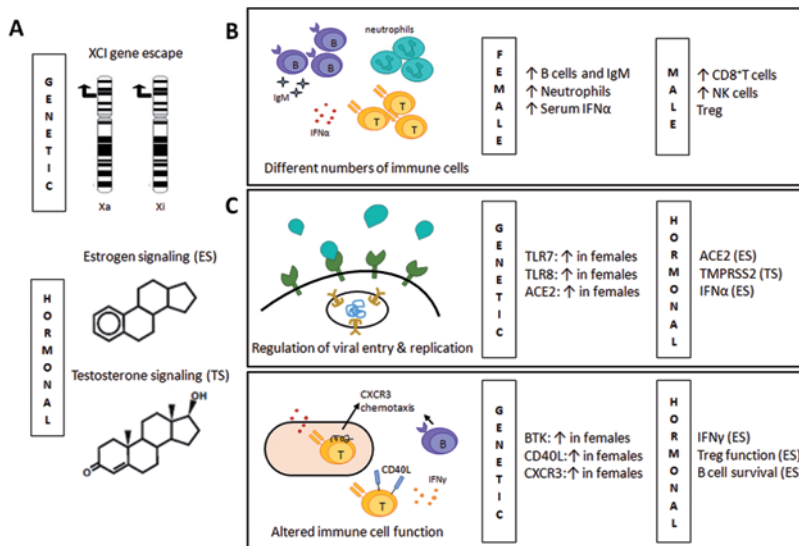


Fig. 6. Contributo di fattori genetici e ormonali a risposte immunologiche differenziali tra maschi e femmine. A) “Escape” di geni X-linked all’inattivazione del cromosoma X. B) Diverso numero di cellule e mediatori del siero coinvolti nella risposta immunitaria in maschi e femmine. *Legenda*: cellule B (viola), neutrofili (turchese), cellule T (arancio), IFN $\alpha$  (puntini rossi). C) Esempi di alterazioni dell’espressione genica innescate da fattori genetici e/o ormonali che portano a risposta immunitaria “sex biased”. *Legenda*: virus (turchese), recettore cellulare per il virus (verde), TLR7 e TLR8 endosomali (arancio), RNA virale (filamenti blu), cellule B (viola), cellule T (arancio), CD40L (azzurro su linfociti T), CXCR3 (puntini porpora), IFN $\gamma$  (puntini arancio). Modificata da: Forsyth KS, Anguera MC, *Curr Opin Physiol.* 2021, 19:62-72 [17].

#### 4. IL CROMOSOMA X E GENI IMMUNO-RELATI

La Fig. 7 mostra una selezione di geni immuno-relati posizionati sull’idiogramma del cromosoma X umano. La probabilità di sfuggire all’inattivazione (completa o variabile tra individui e tessuti) varia tra i

geni e tra le diverse regioni cromosomiche. Nella regione del braccio corto dell'X (Xp22) prona a sfuggire all'inattivazione *TLR7*, *TLR8*, *ACE2* e *CYBB* hanno espressione biallelica nelle femmine. *TLR7* e *TLR8* (Toll Like Receptor 7 e 8), geni con ruolo chiave nella risposta immunitaria innata, che rappresenta la prima linea di difesa dell'organismo, codificano recettori della famiglia Toll-like che riconoscono patogeni virali tra cui l'RNA a singolo filamento di COVID-19 in seguito al cui legame promuovono la produzione di citochine pro-infiammatorie, quali l'interferon di tipo 1 (vedi oltre).

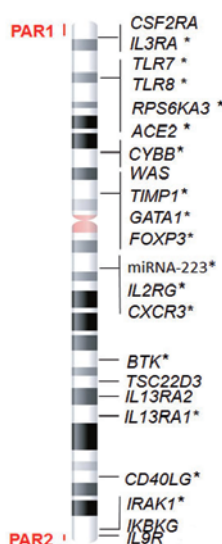


Fig. 7. Selezione di geni del cromosoma X che influenzano la risposta immunitaria. Il cromosoma X contiene circa 1100 geni e tra essi un centinaio influenzano direttamente o indirettamente l'immunità innata e adattativa. I geni asteriscati sono noti per sfuggire completamente o incompletamente l'inattivazione a cui soggiace la maggior parte del cromosoma X tranne le regioni PAR1 e PAR2. L'espressione biallelica di questi geni in cellule immunocompetenti contribuisce al sex bias dei maschi a malattie infettive così come al sex bias delle femmine a parecchie malattie autoimmuni.

*ACE2* (Angiotensinogen Converting Enzyme 2) è cruciale per la patogenesi di COVID-19 perché il tropismo cellulare del virus si basa sull'interazione della proteina Spike, contenuta nelle strutture che formano la corona di SARS-CoV-2, con il recettore cellulare *ACE2* che insieme alla serinproteasi *TMPRSS2*, determina un riarrangiamento

conformazionale che provoca la fusione delle membrane e quindi l'infezione [20]. Inoltre *ACE2* ha nel promotore elementi di risposta agli estrogeni che ne influenzano l'espressione per cui anche per questo le donne in età riproduttiva hanno la potenzialità di produrre una maggior quantità rispetto ai maschi. L'aumentata espressione di *ACE2*, porta di ingresso del virus COVID-19 nelle cellule umane, dovrebbe causare una maggior gravità dell'infezione nelle donne, che però non si osserva clinicamente [4]. Studi recenti indicano che le donne esprimono livelli di *ACE2* più elevati dei maschi in vari tessuti, inclusi il polmone e gli endoteli e sono protette da tali elevati livelli perché *ACE2* regola negativamente l'angiotensinogeno che promuove danno polmonare e disfunzione vascolare, mostrando quindi ridotta suscettibilità a grave malattia polmonare e altre complicanze vascolari causate dall'infezione (Fig. 8) [17].

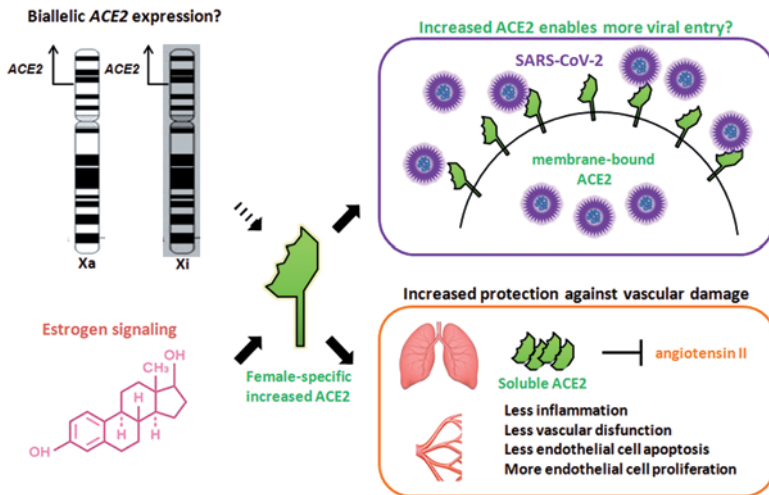


Fig. 8. Effetti diversi dell'espressione biallelica di *ACE2* nella suscettibilità a SARS-CoV-2 e gravità della malattia da Covid-19. Il gene *ACE2* sfugge all'inattivazione dell'X ed è quindi espresso biallelicamente nelle donne oltre ad essere influenzato positivamente dagli estrogeni. Poiché il recettore *ACE2* sulla membrana cellulare costituisce la porta di ingresso di COVID-19 nelle cellule umane ci si potrebbe attendere una maggior gravità dell'infezione nelle donne, contraddetta però dalle osservazioni cliniche. La forma solubile di *ACE2* è un inibitore dell'angiotensina II, che promuove disfunzione vascolare e infiammazione a livello di vari tessuti, tra cui i polmoni. Livelli elevati di *ACE2* sarebbero protettivi riducendo il rischio di danno polmonare ed evoluzione grave della malattia. Modificata da: Forsyth KS, Anguera MC, *Curr Opin Physiol.* 2021;19:62-72 [17].

Proseguendo nell'esemplificazione di geni dell'X implicati nella risposta immunitaria e che sfuggono a XCI, *CYBBP* (cytochrome b-245 beta polypeptide) (*Fig. 7*) codifica per subunità catalitiche dell'enzima responsabile della produzione di superossidi da parte dei fagociti durante il burst ossidativo: le sue mutazioni sono responsabili della malattia granulomatosa cronica fatale nei maschi perché il mancato killing dei patogeni provoca infezioni ricorrenti e sepsi. Nella regione Xp11 con bassa probabilità di sfuggire a XCI mappano geni caratterizzati da espressione variabile da parte del cromosoma X inattivo, quali *TIMP1* (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) che codifica un membro di una famiglia di proteine coinvolte nella risposta alle infezioni e allo shock settico e *FOXP3* (Fork head Box P3) per un fattore di trascrizione chiave per l'attivazione delle cellule T (*Fig. 7*). Il braccio lungo del cromosoma X che rappresenta la regione più conservata sotto il profilo evolutivo, contiene geni sensibili al dosaggio e strettamente sottoposti a XCI. Ci sono però regioni dove risiedono geni immuno-relati che sfuggono all'inattivazione in linfociti B e T maturi e per vantaggio funzionale diventano nelle donne iperespressi nei tessuti coinvolti nella risposta immunitaria: tra questi diversi geni per recettori di citochine (*ILR2G*, *IL13RA2*, *IL13RA1*) e chemochine, quale ad esempio *CXCR3* per chemochine con il motivo CXC, *BTK* (Bruton Tyrosine kinase) il cui prodotto è fondamentale per il differenziamento e attivazione dei linfociti B, *CD40L* che codifica una proteina (ligando di CD40) membro della famiglia del TNF (Tumor Necrosis Factor) che attiva il recettore delle cellule T necessario per la proliferazione delle cellule B, e *IRAK1* (Interleukin Receptor Associated Kinase 1), coinvolta nella via segnalatica dei recettori toll-like (*Fig. 7*).

Uno studio recente che utilizza una piattaforma tecnologica avanzata ha dimostrato un'ampia eterogeneità nell'"escape" da XCI di *TLR7* e altri quattro geni dell'X (*RPS6KA3*, *CYBB*, *BTK* e *IL13RA1*) a livello di singole cellule plasmacitoidi dendritiche (pDC). La percentuale di pDC con espressione biallelica dei geni analizzati è risultata variabile nello stesso individuo dal 5.6% al 37.3%. È stato dimostrato a livello di singola cellula che all'espressione biallelica corrisponde un livello maggiore di RNA messaggero di *TLR7* e di diversi geni per interferoni di tipo I: questa condizione fa sì che l'esposizione a interferoni aumenti significativamente con un meccanismo di feedback autocrino e

paracrino la produzione di interferoni, i più potenti antivirali noti, da parte delle cellule dendritiche (Fig. 9) a conferma del contributo di geni del cromosoma X alle differenze tra i sessi nella risposta immunitaria innata [21].

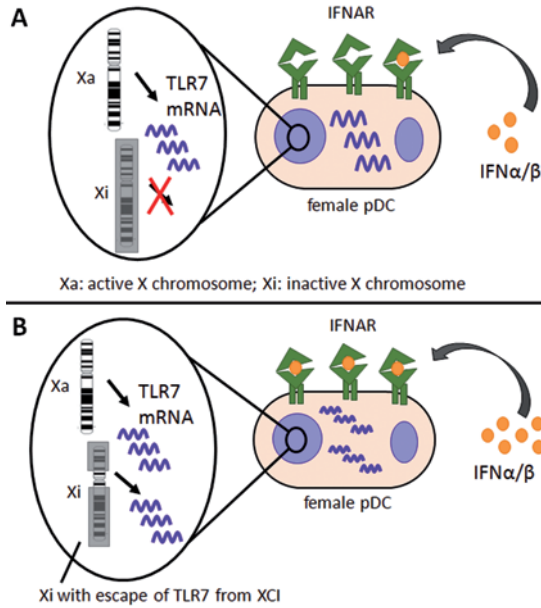


Fig. 9. Eterogeneità nell'“escape” dall'inattivazione del cromosoma X del gene dell'immunità innata TLR7 in cellule plasmacitoidi dendritiche femminili. Sono schematizzate due popolazioni cellulari coesistenti in cellule pDCs della stessa donna: cellule in cui TLR7 è espresso solo dall'X attivo e cellule in cui TLR7 sfugge all'inattivazione. Lo studio a livello di singole pDCs dell'mRNA TLR7-specifico ne rileva una maggiore quantità in cellule con espressione biallelica in cui è promossa maggior quantità di mRNA per interferoni (IFN $\alpha/\beta$ ) e produzione di tali interferoni significativamente più elevata rispetto a cellule con espressione monoallelica. Ciò può innescare un meccanismo auto-crina-paracrino basato sulla presenza del recettore per gli interferoni (IFNAR) sulla membrana di pDCs che porta ad una produzione maggiore nelle femmine. Modificata da: Hagen SH et al *Cell Rep.* 2020,33(10):108485[21].

## 5. MUTAZIONI DEL GENE DELL'IMMUNITÀ INNATA TLR7 IN GIOVANI MASCHI CON MALATTIA COVID-19 GRAVE

L'implicazione di TLR7 come nodo critico nel riconoscimento di COVID-19 e l'inizio della risposta immunitaria per ottenere la clea-



ranche del virus e prevenirne la diffusione è dimostrata da uno studio olandese finalizzato ad esplorare varianti di geni associati alla risposta immune in maschi giovani (età inferiore ai 35 anni) ricoverati per COVID-19 in unità di terapia intensiva [22]. Da notare che 3.5% (399/11.430) dei pazienti ospedalizzati per COVID-19 in Olanda al maggio 2020 aveva età inferiore a 35 anni e che per questo gruppo di età 6 dei 7 pazienti deceduti erano maschi. Lo studio riguarda due coppie di fratelli da famiglie non relate (età media =26 anni) senza comorbidità ricoverati per grave COVID-19 tra fine marzo e metà aprile 2020 in unità di terapia intensiva, uno dei quali deceduto dopo 10 giorni per shock settico. Da notare che tutti e 4 i pazienti al ricovero in unità di terapia intensiva hanno presentato agli esami di laboratorio valori elevatissimi per proteina C reattiva, un marker di infiammazione riconosciuto come predittivo di decorso sfavorevole di polmonite da COVID-19 [7]. Il sequenziamento di nuova generazione dell'esoma (l'intera porzione del genoma codificante proteine) ha evidenziato nei tre maschi sopravvissuti varianti patogenetiche "da perdita di funzione" nel gene *TLR7*. Come appare dall'analisi degli alberi genealogici (*Fig. 10*) la madre dei due fratelli affetti della prima famiglia è portatrice sana di una variante del gene *TLR7*, che trasmette ad entrambi i figli i quali essendo maschi la portano in emizigosi e manifestano il suo effetto in tutte le cellule. I maschi della seconda famiglia condividono una variante di *TLR7* di presunta origine materna (*Fig. 10A*) La variante che segrega nella famiglia 1 è una delezione di 4 basi nell'esone 3 di *TLR7* che fa slittare la cornice di lettura a triplete del codice genetico e porta ad esposizione di un codone di stop della traduzione a valle con predizione di una proteina tronca, mentre la variante della seconda famiglia è una mutazione missenso in una regione del gene altamente intollerante alla variazione, che porta a sostituzione di un singolo aminoacido della proteina recettoriale *TLR7*, indicata come deleteria dai tools bioinformatici predittivi (*Fig. 10B*). Studi funzionali confermano che entrambe le mutazioni sono da "perdita di funzione". Difatti dopo stimolazione in vitro con un agonista di *TLR7* (imiquimod) dei linfociti del sangue periferico dei pazienti non si rileva espressione di mRNA *TLR7*-specifico a differenza dei genitori dei pazienti e dei controlli (*Fig. 11A*). Nelle cellule mononucleate dei pazienti la via segnaletica dell'interferon è downre-

golata, come si evidenzia dalla espressione dei trascritti dei geni *IRF7*, *ISG15* e *IFNB1* e dalla produzione di interferon  $\alpha$  significativamente diminuite nelle cellule mononucleate dei pazienti stimolate in vitro con imiquimod rispetto a genitori e controlli (Fig. 11B,C,D,F). Il signaling indotto dal legame di TLR7 con l'RNA a singolo filamento di SARS-CoV-2 endosomale produce in condizioni fisiologiche effetti a valle che culminano nella trascrizione di geni stimolati dall'interferon e nella produzione di interferoni (Fig. 12A), mentre la disfunzionalità del recettore TLR7 a seguito della mutazione determina il blocco /riduzione di tali effetti (Fig. 12B).

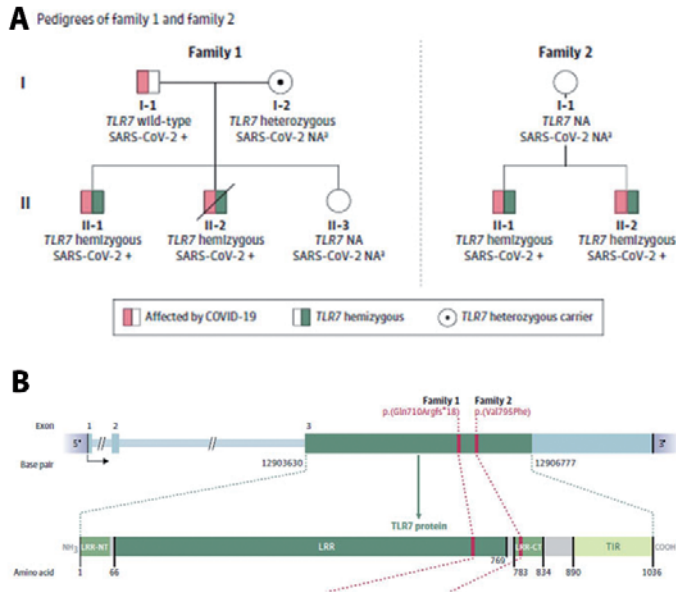


Fig. 10. Identificazione di varianti patogenetiche di TLR7 in 4 pazienti maschi con grave malattia da COVID-19 appartenenti a due famiglie non relate. A) Pedigree delle due famiglie: i quadrati indicano i maschi e i cerchi le femmine. La riga diagonale sul simbolo indica che l'individuo è deceduto. I simboli sono divisi in due parti: l'emiquadrante rosa indica che il soggetto è affetto da COVID-19, l'emiquadrante verde indica la presenza di una mutazione di *TLR7* in emizigosi (i maschi hanno un unico cromosoma X). Il punto all'interno del simbolo della madre dei due affetti della prima famiglia indica che essa è una portatrice sana della mutazione di *TLR7* trasmessa ad entrambi i figli. Anche i maschi della seconda famiglia condividono una variante patogenetica di *TLR7*. B) Mutazioni di *TLR7* in ciascuna famiglia a livello del DNA e della proteina. Modificata da: van der Made CI et al., JAMA. 2020;324(7):663-673[22].

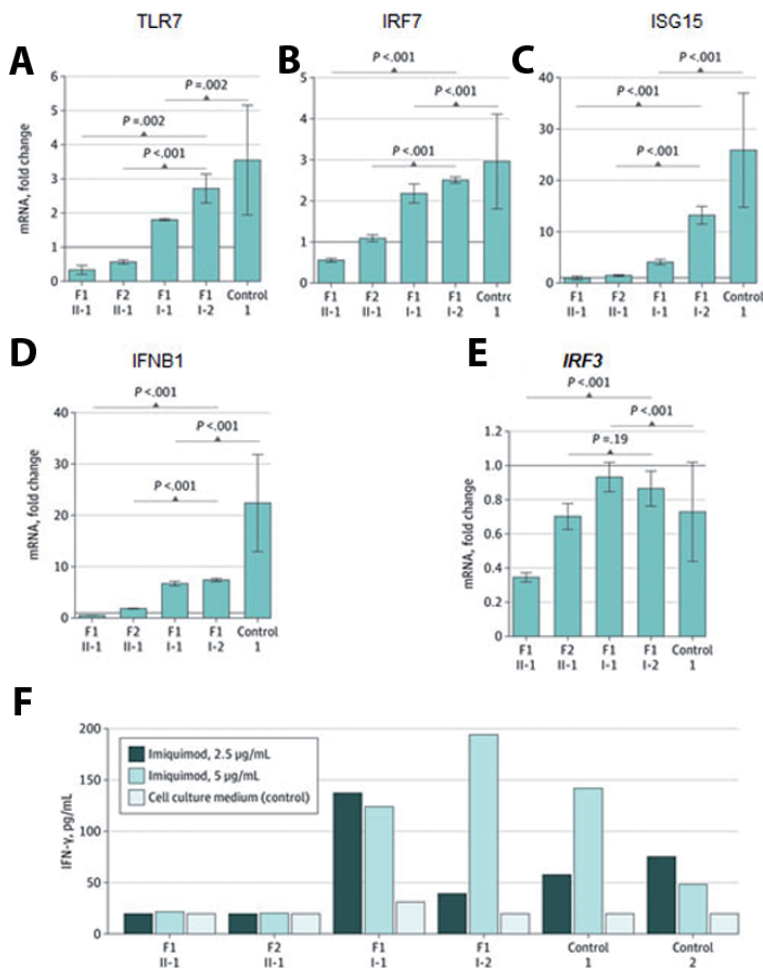


Fig. 11. Determinazione delle risposte degli interferon (IFN) di tipo I e II alla stimolazione con un agonista di TLR7 in cellule mononucleate del sangue periferico di pazienti con COVID-19 grave e varianti da perdita di funzione di TLR7 e controlli. A) Livelli di espressione del trascritto (mRNA) di TLR7 negli affetti (II-1) della prima e seconda famiglia (F1 e F2) rispetto ai genitori (F1) e a controlli sani dopo stimolazione in vitro per 4 hr con imiquimod (5mg/mL) di TLR7. B), C), D) Livelli di espressione di mRNA dei geni, relativi a IFN tipo I, IRF7 (Interferon Regulatory Factor 7), ISG15 (Interferon Stimulated Gene 15) e IFNB1 (Interferon beta 1) e E) IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) indotti da imiquimod 5mg/mL rispetto a controlli negativi. F) Produzione di IFN- $\gamma$  dopo stimolazione con imiquimod per 7 giorni rispetto a cellule di controlli non stimolate. Modificata da: van der Made CI et al., JAMA. 2020;324(7):663-673[22].

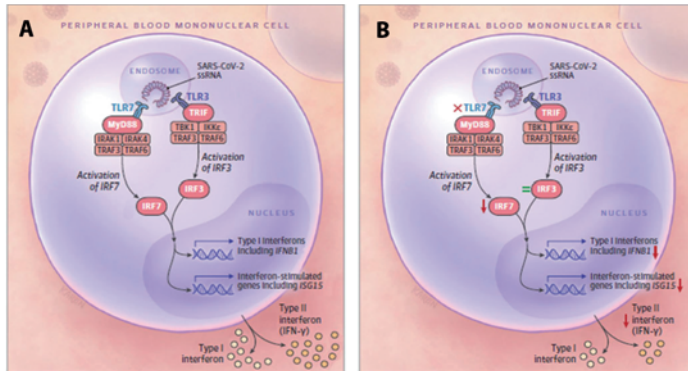


Fig. 12. Via segnaletica del recettore TLR7 in cellule mononucleate del sangue periferico. A) Il signaling di TLR7 è attivato dal suo legame all'RNA a singolo filamento (ssRNA) di SARS-CoV-2 all'interno di endosomi. Gli effetti a valle sono trasdotti dalla proteina adattatrice MyD88, le tirosinchinasi associate IRAK1 e IRAK4 e le ubiquitinligasi TRAF3 e TRAF6. Segue l'attivazione del fattore 7 di regolazione dell'interferon, codificato dal gene *IRF7*, che traslocando nel nucleo induce la trascrizione di geni dell'interferon di tipo I che includono *IFNB1* per l'interferon beta 1 e i geni stimolati dall'interferon (*ISGs*) tra cui *ISG15*. In parallelo il recettore TLR3 agisce anch'esso come sensore dell'RNA virale endosomiale e attiva la specifica proteina adattatrice TRIF, le associate chinasi e ligasi che attivano il fattore 3 di regolazione dell'interferon (codificato da *IRF3*) che trasloca nel nucleo dove la sua attività di induzione della trascrizione dei geni per IFN tipo I confluisce con quella di TLR7. B) La deficienza/disfunzione di TLR7 conseguente a mutazioni geniche (indicata dalla crocetta rossa) deprime la regolazione dei geni effettori *IRF7*, *IFNB1* e *ISG15* (freccette rosse all'ingiù) e la produzione di IFN $\alpha$ . L'attività di TLR3 rimane inalterata (indicato dal segno =). Modificata da: van der Made CI et al., JAMA. 2020;324(7):663-673[22].

La presenza di mutazioni rare nello stesso gene in soggetti con una inusuale presentazione di COVID-19 (malattia grave in giovani maschi precedentemente sani) è statisticamente improbabile si sia verificata per caso. Benché le mutazioni descritte per la loro rarità non giustificano il sex bias dei maschi nella malattia da COVID-19 grave e potenzialmente letale, esse implicano TLR7 come nodo critico nel riconoscimento di COVID-19 e l'inizio della risposta immunitaria precoce per ottenere la clearance del virus e prevenirne la diffusione. Studi di sequenziamento dell'intero esoma volti ad identificare varianti rare e comuni di *TLR7* e di altri geni dell'immunità innata del cromosoma X potranno districare il rapporto causa-conseguenze e definire il contributo della biologia unica del cromosoma X nell'evoluzione grave dell'infezione di SARS-CoV-2, generando strumenti per guidare gli interventi terapeutici atti a prevenire o trattare la patologia.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Karlberg, J., Chong, D. S. & Lai, W. Y. Do men have a higher case fatality rate of severe acute respiratory syndrome than women do? *Am. J. Epidemiol.* 159, 229–231 (2004).
- 2) Alghamdi, I. G. et al. The pattern of Middle East respiratory syndrome coronavirus in Saudi Arabia: a descriptive epidemiological analysis of data from the Saudi Ministry of Health. *Int. J. Gen. Med.* 7,417–423 (2014).
- 3) Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, Radziszewska A, Ciurtin C, Wedderburn LR, Rosser EC, Webb K, Deakin CT. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun.* 2020 Dec 9;11(1):6317. doi: 10.1038/s41467-020-19741-6. PMID: 33298944.
- 4) Scully EP, Haverfield J, Ursin RL, Tannenbaum C, Klein SL. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. *Nat Rev Immunol.* 2020 Jul;20(7):442-447. doi: 10.1038/s41577-020-0348-8. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32528136; PMCID: PMC7288618.
- 5) Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, Israelow B, Lucas C, Klein J, Silva J, Mao T, Oh JE, Tokuyama M, Lu P, Venkataraman A, Park A, Liu F, Meir A, Sun J, Wang EY, Casanovas-Massana A, Wyllie AL, Vogels CBF, Earnest R, Lapidus S, Ott IM, Moore AJ; Yale IMPACT Research Team, Shaw A, Fournier JB, Odio CD, Farhadian S, Dela Cruz C, Grubaugh ND, Schulz WL, Ring AM, Ko AI, Omer SB, Iwasaki A. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature.* 2020 Dec;588(7837):315-320. doi: 10.1038/s41586-020-2700-3. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32846427; PMCID: PMC7725931.
- 6) Takahashi T, Iwasaki A. Sex differences in immune responses. *Science.* 2021 Jan 22;371(6527):347-348. doi: 10.1126/science.abe7199. PMID: 33479140.
- 7) Scully EP, Gupta A, Klein SL. Sex-biased clinical presentation and outcomes from COVID-19. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Apr 1:S1198-743X(21)00162-2. doi: 10.1016/j.cmi.2021.03.027. Epub ahead of print. PMID: 33813116; PMCID: PMC8015344.
- 8) Lyon M. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.) *Nature* 190, 372 - 373 (22 aprile 1961).
- 9) Strachan T & Read A, *Genetica Molecolare Umana* (prima Edizione Zanichelli condotta sulla quarta Edizione Americana, Maggio 2012), Pag. 418.
- 10) Galupa R, Heard E. X-Chromosome Inactivation: A Crossroads Between Chromosome Architecture and Gene Regulation. *Annu Rev Genet.* 2018 Nov 23;52:535-566. doi: 10.1146/annurev-genet-120116-024611. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30256677.
- 11) Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet.* 2001 Jan;2(1):59-67. doi: 10.1038/35047580. PMID: 11253071.
- 12) Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature.* 2005 Mar 17;434(7031):400-4. doi: 10.1038/nature03479. PMID: 15772666.
- 13) Tukiainen T, Villani AC, Yen A, Rivas MA, Marshall JL, Satija R, Aguirre M,

- Gauthier L, Fleharty M, Kirby A, Cummings BB, Castel SE, Karczewski KJ, Aguet F, Byrnes A; GTE<sub>x</sub> Consortium; Laboratory, Data Analysis & Coordinating Center (LDACC)—Analysis Working Group; Statistical Methods groups—Analysis Working Group; Enhancing GTE<sub>x</sub> (eGTE<sub>x</sub>) groups; NIH Common Fund; NIH/NCI; NIH/NHGRI; NIH/NIMH; NIH/NIDA; Biospecimen Collection Source Site—NDRI; Biospecimen Collection Source Site—RPCI; Biospecimen Core Resource—VARI; Brain Bank Repository—University of Miami Brain Endowment Bank; Leidos Biomedical—Project Management; ELSI Study; Genome Browser Data Integration & Visualization—EBI; Genome Browser Data Integration & Visualization—UCSC Genomics Institute, University of California Santa Cruz, Lappalainen T, Regev A, Ardlie KG, Hacohen N, MacArthur DG. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature*. 2017, 550:244-248. doi: 10.1038/nature24265.
- 14) Chamekh M, Casimir G. Editorial: Sexual Dimorphism of the Immune Inflammatory Response in Infectious and Non-infectious Diseases. *Front Immunol*. 2019 Feb 5;10:107. doi: 10.3389/fimmu.2019.00107. PMID: 30804936; PMCID: PMC6371857.
  - 15) Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016 Oct;16(10):626-38. doi: 10.1038/nri.2016.90. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27546235.
  - 16) Schurz H, Salie M, Tromp G, Hoal EG, Kinnear CJ, Möller M. The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. *Hum Genomics*. 2019 Jan 8;13(1):2. doi: 10.1186/s40246-018-0185-z. PMID: 30621780; PMCID: PMC6325731.
  - 17) Forsyth KS, Anguera MC. Time to get ill: the intersection of viral infections, sex, and the X chromosome. *Curr Opin Physiol*. 2021 Feb;19:62-72. doi: 10.1016/j.cophys.2020.09.015. Epub 2020 Oct 13. PMID: 33073073; PMCID: PMC7553007.
  - 18) Syrett CM, Anguera MC. When the balance is broken: X-linked gene dosage from two X chromosomes and female-biased autoimmunity. *J Leukoc Biol*. 2019 Oct;106(4):919-932. doi: 10.1002/JLB.6RI0319-094R. Epub 2019 May 24. PMID: 31125996; PMCID: PMC7206452.
  - 19) Wang J, Syrett CM, Kramer MC, Basu A, Atchison ML, Anguera MC. Unusual maintenance of X chromosome inactivation predisposes female lymphocytes for increased expression from the inactive X. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Apr 5;113(14):E2029-38. doi: 10.1073/pnas.1520113113. Epub 2016 Mar 21. PMID: 27001848; PMCID: PMC4833277.
  - 20) Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*. 2020; May 14;181(4):894-904.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32275855; PMCID: PMC7144619.
  - 21) Hagen SH, Henseling F, Hennesen J, Savel H, Delahaye S, Richert L, Ziegler SM, Altfeld M. Heterogeneous Escape from X Chromosome Inactivation Results in Sex Differences in Type I IFN Responses at the Single Human pDC

- 
- Level. *Cell Rep.* 2020 Dec 8;33(10):108485. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108485. PMID: 33296655; PMCID: PMC7833293.
- 22) van der Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J, van den Heuvel G, Mantere T, Kersten S, van Deuren RC, Steehouwer M, van Reijmersdal SV, Jaeger M, Hofste T, Astuti G, Corominas Galbany J, van der Schoot V, van der Hoeven H, Hagmolen Of Ten Have W, Klijn E, van den Meer C, Fiddelaers J, de Mast Q, Bleeker-Rovers CP, Joosten LAB, Yntema HG, Gilissen C, Nelen M, van der Meer JWM, Brunner HG, Netea MG, van de Veerdonk FL, Hoischen A. Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA.* 2020 Aug 18;324(7):663-673. doi: 10.1001/jama.2020.13719. PMID: 32706371; PMCID: PMC7382021.

## APPENDICE A

### Immunità innata e adattativa

**Immunità innata:** sistema caratterizzato da meccanismi di difesa pre-esistenti all'infezione e per questo non dotati di specificità, ma di rapidità di azione. Costituisce la prima linea di difesa contro agenti patogeni chimici, fisici e biologici.

**Cellule immunità innata:** riconoscono molecole comuni a classi di microbi diversi e non hanno memoria. Rispondono ai patogeni liscando cellule infettate e fagocitando le particelle infettive e rilasciando segnali. Comprendono Neutrofili, Mastcellule, Macrofagi, Cellule Natural killer (NK) e Cellule plasmacitoidi dendritiche (pDC).

**NK:** grandi linfociti granulari capaci di distruggere cellule infettate da virus senza precedente esposizione o presentazione.

**pDC:** così chiamate per la forma ramificata derivano dalle cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo. Appartengono alla categoria delle cellule che presentano l'antigene (APC o Antigen Presenting Cells): possono internalizzare l'antigene e processarlo per la presentazione ai linfociti T o mantenerlo sulla loro superficie in forma nativa disponibile ai linfociti B specifici per quell'antigene. Secernono grandi quantità di interferon di tipo 1 in risposta a infezioni virali.

**Tutti i fagociti agiscono in concerto con mediatori plasmatici** che includono, oltre al **sistema del complemento** le **Citochine**, proteine che fungono da segnali di comunicazione tra le cellule del sistema immunitario e tra queste e i diversi organi e tessuti e le **Chemochine**, proteine segnaletiche coinvolte nella chemiotassi di cellule della risposta immunitaria nell'area di infiammazione.

**Immunità adattativa:** sistema caratterizzato dall'adattamento a ciascun agente patogeno e conseguente risposta specifica che necessita di più tempo per agire rispetto all'immunità innata. Si distingue in immunità umorale e cellulo-mediata a seconda che il patogeno sia esogeno o endogeno.

**Cellule dell'immunità adattativa:** nel caso di patogeni e tossine extracellulari sono attivati i **linfociti B** che secernono allo stadio di plasmacellule anticorpi specifici che legano e neutralizzano lo specifico antigene. Dopo l'incontro con l'antigene alcune cellule B antigene-specifiche entrano nei centri germinativi di organi linfoidi e cambiano il dominio costante dei loro geni per le immunoglobuline deter-



minando una maggiore affinità per quello specifico antigene. Sono anche generate cellule “memoria” a lunga vita in grado di rispondere rapidamente nel caso di un secondo assalto da parte dello stesso patogeno.

Nel caso di antigeni endogeni sono attivati i **linfociti T** che si dividono in helper, citotossici e soppressori. Gli **helper**, sottotipo di linfociti CD4+, riconoscono gli antigeni esposti sulla superficie di cellule deputate alla “presentazione” dell’antigene, secernono citochine che attivano i fagociti a distruggere i microorganismi che hanno inglobato e coadiuvano i linfociti B nella produzione di anticorpi. I **citotossici** CD8+ riconoscono antigeni esposti sulla membrana di cellule infettate e le lisano e i **soppressori** o **Treg**, sottotipo di linfociti CD4+, modulano la risposta immunitaria all’infezione sopprimendo le cellule T autoreattive in periferia.

L’immunità innata e adattative agiscono in cooperazione bidirezionale per generare una risposta più mirata ed efficace.

