



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Medicina Sperimentale

DOTTORATO DI RICERCA
in
MEDICINA SPERIMENTALE
XXXVIII ciclo

**Ruolo dell'17 β -estradiolo nella regolazione della
risposta immunitaria umana: focus sui recettori
degli estrogeni**

Dottoranda
Dr.ssa Maria Teresa Pagano

Tutor
Dr.ssa Maria Cristina Gagliardi

Coordinatore
Prof. Maurizio Sorice

Anno Accademico 2024-2025

*Non temere i momenti difficili:
è da lì che nascono le opportunità.*

Rita Levi Montalcini

INDICE

SOMMARIO	4
ABSTRACT	7
INTRODUZIONE	
GLI ESTROGENI	10
Recettori degli estrogeni e loro meccanismo d'azione	12
GLI ESTROGENI NELLA REGOLAZIONE DELLA RISPOSTA	
IMMUNITARIA.....	20
Le cellule dell'immunità innata.....	24
Le cellule dell'immunità adattativa	33
Ruolo degli estrogeni nella regolazione della risposta immunitaria.....	41
<i>LIPID RAFTS</i> E RECETTORI DEGLI ESTROGENI	
<i>Lipid Rafts</i>	47
<i>Lipid Rafts</i> nelle cellule del sistema immunitario.....	50
Recettori degli estrogeni e <i>lipid rafts</i>	55
SCOPO DEL PROGETTO	58
MATERIALI E METODI	
Isolamento delle popolazioni cellulari e loro condizioni di coltura	60
Trattamenti con estrogeno.....	63
Reazione leucocitaria mista (MLR).....	64
Analisi delle citochine mediante Cytometric Bead Array (CBA)	65
Analisi mediante citofluorimetria	66

Immunofluorescenza e microscopia confocale a scansione laser (CSLM)	68
Isolamento dei <i>lipid rafts</i> su gradiente di saccarosio.....	69
Immunoblotting.....	70
Analisi statistica.....	71

RISULTATI

ER α e ER β sono espressi nei linfociti T: l'attivazione con l'anticorpo anti-CD3 induce l'up-regolazione di ER α mentre il trattamento con E2 induce la localizzazione nei <i>lipid rafts</i>	72
E2 inibisce la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di linfociti T	76
ER α e ER β sono espressi nei monociti e nelle cellule dendritiche umane: il processo di differenziamento Mo-DC ne modula l'espressione	79
Il trattamento con E2 induce la localizzazione di ER α nei <i>lipid rafts</i> delle DC	81
Il trattamento con E2 non altera il differenziamento e la maturazione delle DC umane	86
Il trattamento con E2 inibisce l'up-regolazione delle molecole MHC di II classe ma non altera la produzione di citochine indotte dalla maturazione delle DC con LPS	89
Il trattamento con E2 inibisce la proliferazione dei linfociti T umani e la produzione di citochine pro-infiammatorie in risposta a DC allojeniche maturate con LPS.....	92
Le iNKT umane esprimono ER α e ER β ed il trattamento con E2 ne inibisce la risposta antigene-specifica.....	96
DISCUSSIONE	100

LISTA ABBREVIAZIONI	105
REFERENZE	106

SOMMARIO

Gli estrogeni, in particolare il 17β -estradiolo (E2), svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta immunitaria e contribuiscono alle differenze osservate tra i sessi nelle risposte immunomediate. I loro effetti biologici sono mediati da due distinte forme di recettori intracellulari, ER α ed ER β , che, una volta attivati, agiscono come fattori di trascrizione nucleari ligando-dipendenti, inducendo effetti di tipo "genomico". Sebbene la maggior parte delle cellule immunitarie umane esprima entrambi i recettori, la loro localizzazione subcellulare e l'effettivo contributo alla modulazione fenotipica e funzionale della risposta immunitaria rimangono ancora poco definiti. Inoltre, pur essendo nota l'attività immunosoppressiva degli estrogeni durante la gravidanza, non sono ancora stati completamente descritti i meccanismi alla base di questo effetto.

Gli obiettivi del presente progetto di ricerca sono stati quelli di analizzare l'espressione e la distribuzione di ER α ed ER β in cellule del sistema immunitario umano, in particolare monociti, cellule dendritiche (DC), linfociti T e cellule iNKT (*invariant Natural Killer T cells*) e di valutare gli effetti dell'E2, utilizzato a concentrazioni fisiologiche tipiche della gravidanza, sulla risposta immunitaria innata mediata dalle DC differenziate da monociti umani e sulla risposta immunitaria adattativa mediata da linfociti T e iNKT umane. A questo scopo sono stati analizzati: i) l'espressione dei recettori in condizioni basali e dopo stimolazione con E2; ii) gli effetti dell'ormone sulla differenziazione, maturazione, secrezione di citochine e funzione di presentazione dell'antigene da parte delle DC; iii) la

risposta antigene-specifica da parte di linfociti T e iNKT in termini di proliferazione e produzione di citochine.

I risultati ottenuti supportano che, nei linfociti T e nelle DC di soggetti sani, l'E2, a concentrazioni tipiche della gravidanza, induce una parziale localizzazione di ER α nei *lipid rafts*, regioni specializzate della membrana plasmatica, ricche di colesterolo e sfingolipidi. Si è osservato, inoltre, che l'E2 non interferisce con il differenziamento dei monociti in DC, suggerendo che l'attivazione dei recettori ER α /ER β non altera i *pathways* di segnalazione citochino-dipendenti coinvolti in tale processo. Nelle DC già differenziate, l'E2 non induce *per sé* la maturazione delle DC, ma è in grado di inibire l'up-regolazione delle molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) di II classe indotta da stimolazione con lipopolisaccaride batterico (LPS) e la conseguente presentazione dell'antigene e proliferazione dei linfociti T CD4⁺ in una reazione leucocitaria mista (*Mixed Lymphocyte Reaction*, MLR). Infine, è stato osservato che l'E2 agisce direttamente sui linfociti T, riducendo la produzione di citochine pro-infiammatorie (IFN- γ , TNF- α e IL-17) e inibendo l'espansione delle cellule iNKT α -galactosylceramide (α -GalCer)-specifiche.

In conclusione, i dati ottenuti nel corso del mio progetto di dottorato confermano il ruolo immunosoppressivo dell'estrogeno osservato durante la gravidanza – fondamentale per il mantenimento della tolleranza materno-fetale – e mostrano come tale effetto si rifletta in una modulazione significativa sia della risposta immunitaria innata che adattativa umana. Inoltre, l'identificazione di ER α nei *lipid rafts* di linfociti T e DC apre nuove prospettive sul possibile coinvolgimento di questi microdomini di membrana nell'attivazione di vie di segnalazione non genomiche indotte

dall'E2, potenzialmente responsabili della regolazione rapida e fine delle risposte immunitarie. L'inibizione, da parte degli estrogeni ad alta concentrazione, della risposta antigene-specifica delle cellule iNKT, apre un nuovo scenario sui possibili effetti di questi ormoni nella regolazione della risposta di questa popolazione linfocitaria, che riveste un ruolo cruciale sia nei processi infettivi che nello sviluppo delle patologie autoimmuni.

Nel complesso, l'E2, a concentrazioni elevate corrispondenti a quelle riscontrabili durante la gravidanza, è in grado di modulare selettivamente la funzione delle cellule del sistema immunitario rappresentando un importante meccanismo protettivo nei confronti delle malattie autoimmuni.

I dati ottenuti suggeriscono l'utilizzo di fitoestrogeni o di agonisti selettivi dei recettori estrogenici per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nelle malattie immunomediate.

ABSTRACT

Estrogens, in particular 17 β -estradiol (E2), play a critical role in regulating immune response and contribute to the sex-related differences observed in immune-mediated responses. Their biological effects are mediated by two distinct forms of intracellular receptors, ER α and ER β , which act as ligand-dependent nuclear transcription factors, thereby inducing “genomic” effects. Although most human immune cells express both receptors, their subcellular localization and their specific contribution to the phenotypic and functional modulation of immune responses remain poorly defined. Moreover, although the immunosuppressive activity of estrogens during pregnancy is well known, the mechanisms underlying this effect have not yet been fully elucidated.

The aims of this research project were to analyze the expression and distribution of ER α and ER β in human immune system cells—specifically monocytes, dendritic cells (DC), T lymphocytes, and invariant Natural Killer T cells (iNKT)—and to evaluate the effects of E2, used at physiological concentrations typical of pregnancy, on the innate immune response mediated by human monocyte-differentiated DCs and on the adaptive immune response mediated by human T and iNKT cells. To this end, we analyzed: i) receptor expression under basal conditions and after E2 stimulation; ii) the effects of the hormone on DC differentiation, maturation, cytokine secretion, and antigen-presenting function; iii) the antigen-specific response by T lymphocytes and iNKT in terms of proliferation and cytokine production.

The results show that, in T lymphocytes and DCs from healthy donors, E2, at concentrations typical of pregnancy, induces a partial localization of ER α

in lipid rafts—specialized regions of the plasma membrane rich in cholesterol and sphingolipids. Furthermore, it was observed that E2 does not interfere with monocyte differentiation into DC, suggesting that activation of ER α /ER β does not alter the cytokine-dependent signaling pathways involved in this process. In differentiated DCs, E2 does not induce DC maturation *per se* but is able to inhibit the LPS-induced upregulation of class II Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules and the consequent antigen presentation and proliferation of CD4⁺ T lymphocytes in a mixed lymphocyte reaction (MLR). Finally, E2 was found to act directly on T lymphocytes, reducing the production of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , and IL-17) and inhibiting the expansion of α -galactosylceramide (α -GalCer)-specific iNKT cells.

In conclusion, the data obtained during this doctoral project support the immunosuppressive role of estrogen observed during pregnancy—essential for maintaining maternal-fetal tolerance—and show how this effect translates into a significant modulation of both innate and adaptive human immune responses. Moreover, the identification of ER α in lipid rafts of T lymphocytes and DC opens new perspectives on the possible involvement of these membrane microdomains in the activation of non-genomic signaling pathways induced by E2, potentially responsible for the rapid and fine regulation of immune responses. The inhibition, by estrogens at high concentrations, of the antigen-specific response of iNKT cells opens a new scenario regarding the possible effects of these hormones in regulating the activity of this lymphocyte population, which plays a crucial role in both infectious processes and the development of autoimmune diseases.

Overall, E2, at high concentrations reached during pregnancy, can selectively modulate the function of immune system cells, representing an important protective mechanism against autoimmune diseases. The data obtained suggests the potential use of phytoestrogens or selective estrogen receptor agonists for the development of new therapeutic strategies in immune-mediated diseases.

INTRODUZIONE

GLI ESTROGENI

Gli estrogeni sono ormoni endogeni fondamentali per la maturazione degli organi genitali femminili e per lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari femminili. Oltre al loro ruolo principale nell'apparato riproduttivo, gli estrogeni svolgono numerose altre funzioni fisiologiche, agendo su diversi organi e tessuti. Diversi lavori evidenziano il loro coinvolgimento nella regolazione della funzionalità cardiovascolare (1) e cerebrale (2), nel metabolismo osseo (3) e nello sviluppo e nella funzionalità del sistema immunitario. In particolare, gli estrogeni agiscono da regolatori sia delle risposte immunitarie innate [mediate da neutrofili, monociti/macrofagi, cellule natural killer (NK), cellule dendritiche (DC)] sia di quelle adattative (mediate da linfociti B e T) (4 2005, Sex hormones and the immune response in humans, 5).

Tra gli estrogeni naturali, il 17β -estradiolo (E2) rappresenta la forma biologicamente più attiva nella specie umana, seguito dall'estrone (E1) e dall'estriolo (E3) (6). Ciascuna di queste molecole è uno steroide a 18 atomi di carbonio (C18), contenente 3 cicloesani (A, B, C) ed un ciclopentano (D); l'anello A, di natura fenolica, presenta un gruppo idrossilico in posizione 3, mentre l'anello D può contenere un gruppo β -idrossilico o un chetone in posizione 17. La presenza dell'anello fenolico A costituisce la principale caratteristica strutturale responsabile del legame selettivo e ad alta affinità con il recettore estrogenico (6). La biosintesi degli estrogeni ha origine dal colesterolo e procede attraverso intermedi steroidei come l'androstenedione e/o il testosterone, mediante l'aromatizzazione dell'anello A, il coinvolgimento del complesso enzimatico monoossigenasi

(aromatasi) e l'utilizzo di co-substrati quali NADPH e l'ossigeno molecolare (6) (Figura 1). I principali siti di sintesi degli estrogeni sono le ovaie, i testicoli e le ghiandole surrenali (4, 5), dove avviene la produzione e la conversione dei precursori steroidei.

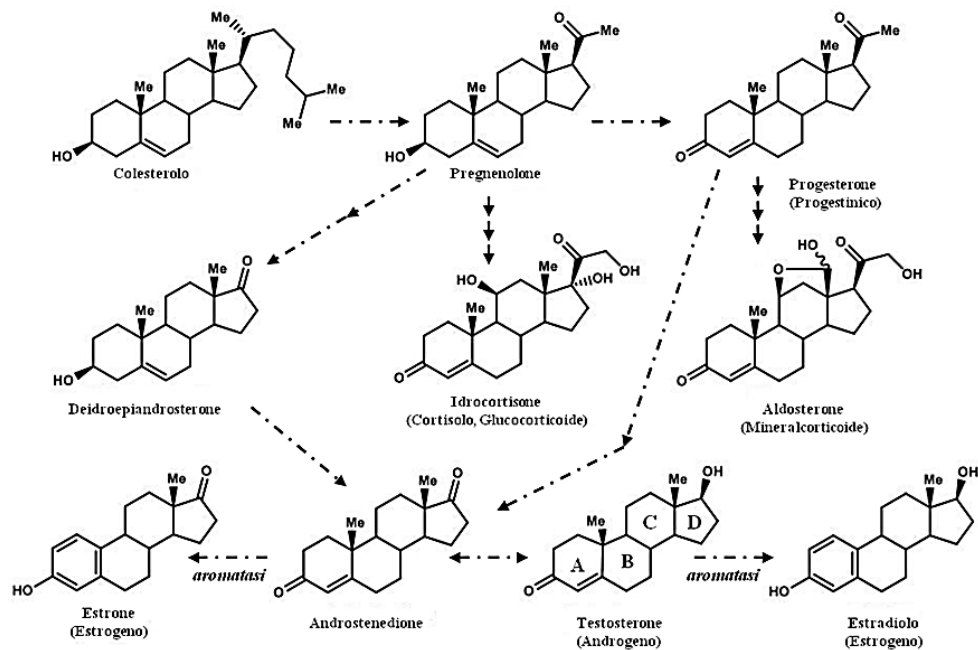
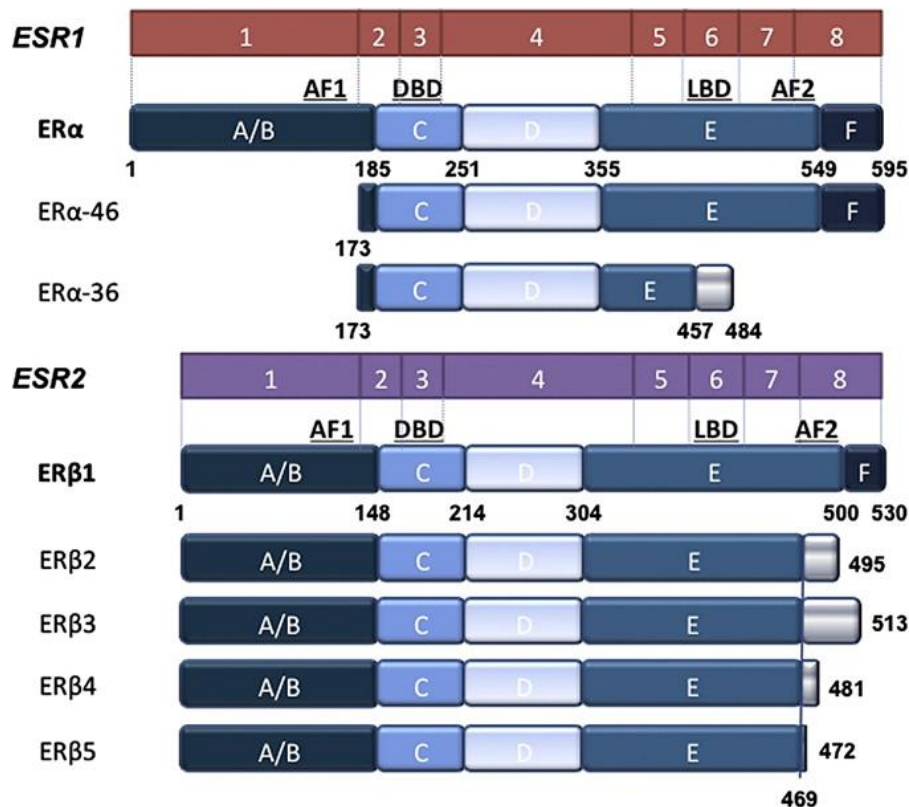


Figura 1. La via biosintetica degli estrogeni.

La reazione di sintesi degli estrogeni dai precursori immediati (androstenedione e/o testosterone) coinvolge l'aromatizzazione dell'anello A ed è catalizzata in tre tappe dal complesso enzimatico monoossigenasi (aromatasi). I precursori immediati sono sintetizzati dal colesterolo, in seguito ad una serie di reazioni biochimiche specifiche.

Recettori degli estrogeni e loro meccanismo d'azione

Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati dal loro legame a specifici recettori (*estrogen receptor*, ER) intracellulari, ER α ed ER β , appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari (*nuclear receptor*, NR). ER α e ER β sono codificati da due geni diversi, ESR1 e ESR2 rispettivamente (7, 8) e differiscono per espressione tissutale e funzioni. ER α è localizzato prevalentemente nella prostata, nell'utero, nella ghiandola mammaria e nell'endometrio mentre ER β è presente principalmente nei testicoli, nelle ghiandole surrenali, nel colon e nei polmoni (9, 10). Sia ER α sia ER β sono stati trovati espressi nelle cellule del sistema immunitario (11). Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di varianti di *splicing* dell'mRNA di ER α e di ER β la cui funzione e il cui ruolo in condizioni fisiologiche e patologiche nell'uomo rimane ancora poco chiaro (12, 13). Tre isoforme di ER α (di 66, 46 e 36 kDa) e 5 isoforme di ER β (dai 53 ai 59 kDa) sono state identificate. ER α e ER β condividono una chiara omologia, sono entrambe costituite da tre domini funzionali interagenti ma indipendenti: il dominio A/B o NH₂-terminale, il dominio C o di legame al DNA (*DNA Binding Domain*, DBD) e il dominio D/E/F o di legame al ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD) (12, 13) (Figura 2).



Gibson A, et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2012

Figura 2. Rappresentazione dei domini di struttura proteica e delle varianti di *splicing* di ER α e di ER β .

In figura sono mostrati i domini funzionali di ER α e di ER β : il dominio NH₂-terminale (A/B), il dominio di legame al DNA (C) e il dominio di legame al ligando (E/F). Le varianti di *splicing* di ER α di 66, 46 e 36 kDa mostrate derivano da un fenomeno di "exon skipping" (salto dell'esone) che porta a delle proteine tronche con diversa funzione. Le varianti di *splicing* di ER β , sono inoltre mostrate, e presentano delle delezioni a livello del dominio COOH-terminale (E/F). AF-1 = Activation Function-1; DBD = DNA Binding Domain; LBD = Ligand Binding Domain; AF-2 = Activation Function-2.

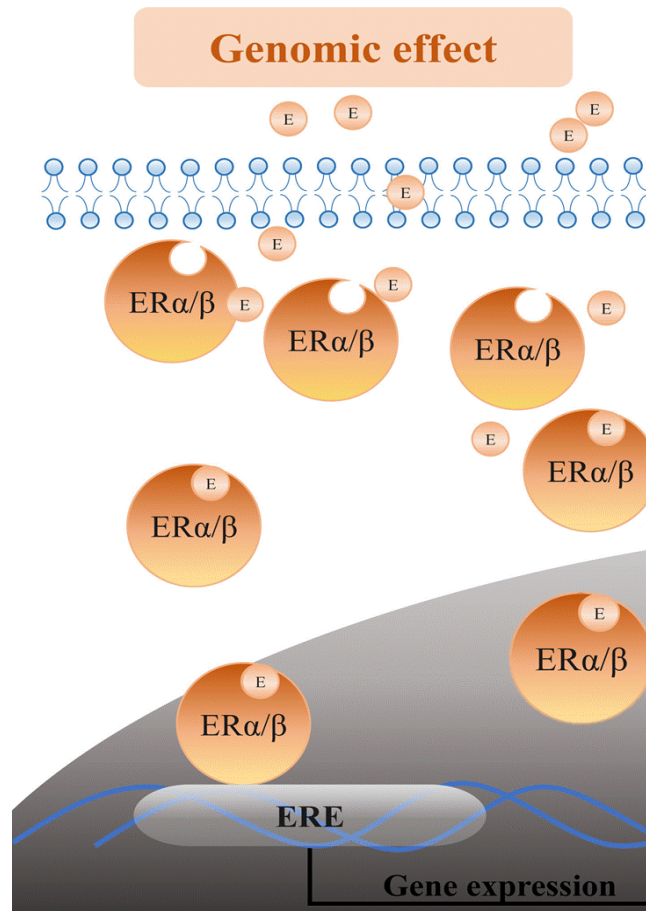
ER α ed ER β sono costituiti da sei domini (14) con elevata omologia di sequenza (96%) nella zona che lega il DNA, mentre hanno strutture distinte nel sito di interazione con i ligandi (53% di omologia); in particolare, la regione NH₂-terminale (dominio A/B) è altamente variabile contribuendo alla sua specificità d'azione. Questa regione codifica per un dominio di attivazione funzionale-1 (*Activation Function-1*, AF-1) coinvolto nell'interazione proteina-proteina e nell'attivazione trascrizionale, ligando-indipendente, del gene bersaglio responsabile dell'attivazione costitutiva della trascrizione genica.

La regione maggiormente conservata è il dominio di legame al DNA (DBD) che contiene due motivi a dita di Zinco (*zinc-fingers*) importanti nella dimerizzazione e nel legame del recettore alla sequenza specifica sul DNA (*Estrogen Response Elements*, ERE).

Il dominio D (*hinge region*, HR), rappresenta una regione meno conservata e particolarmente flessibile, collega i domini C ed E, e contiene le sequenze di traslocazione nucleare (*Nuclear Localization Signal*, NLS).

La regione COOH-terminale (dominio E/F) è la regione più vasta, moderatamente conservata, responsabile del legame con il ligando (LBD). Il dominio E/F partecipa alla dimerizzazione del recettore, promuove la traslocazione nucleare, grazie alla presenza di una sequenza NLS e la transattivazione, ligando-dipendente, dell'espressione del gene bersaglio grazie alla presenza del dominio di attivazione funzionale-2 (*Activation Function-2*, AF-2) (7, 13). Il dominio LBD, in assenza del ligando, è complessato con le *chaperones* di classe I, *heat shock proteins* (Hsp)70 e Hsp90, che hanno il compito di aprire la cavità di legame e permettere l'accesso del ligando specifico (7). Dopo il legame dell'agonista, sintetico o naturale, il recettore si dissocia dal complesso delle proteine Hsp70 e Hsp90, e dimerizzando in

seguito a cambi conformazionali, trasloca nel nucleo dove, direttamente o indirettamente, si lega alle sequenze ERE che sono localizzate a monte del promotore di specifici geni, dando luogo ad effetti definiti "genomici" (15) (Figura 3).



Chen P, et al. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022

Figura 3. Rappresentazione schematica del classico meccanismo d'azione di ER. L'estradiolo (E2) si lega alle forme inattive di ER α o ER β . In seguito al legame ER trasloca nel nucleo dove lega le sequenze ERE a livello del DNA, insieme ad altre proteine co-regolatorie (non mostrate) al fine di promuovere la trascrizione di geni bersaglio. ERE = *Estrogen Response Elements*.

Oltre al meccanismo d'azione classico, gli estrogeni sono in grado di modulare l'espressione genica anche mediante vie ERE-indipendenti, attraverso l'interazione con fattori di trascrizione come *Activating Protein-1* (AP-1) e *Stimulating Protein-1* (Sp-1) (14, 16). La risposta agli estrogeni dipende da diversi fattori, tra cui la disponibilità del ligando, la concentrazione e la localizzazione dei recettori estrogenici, i livelli delle proteine co-regolatrici e lo stato di condensazione della cromatina.

Studi più recenti hanno inoltre evidenziato la presenza di recettori estrogenici localizzati sulla membrana plasmatica delle cellule (*membrane estrogen receptors*, mER), strutturalmente simili a quelli intracellulari, in grado di indurre effetti rapidi, nell'ordine di secondi o minuti, definiti "non genomici" (17-19). Questi effetti si traducono nell'attivazione di diversi sistemi di trasduzione del segnale, tra cui *Protein Kinase A* (PKA), *Protein Kinase C* (PKC), le vie delle *Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular Signal-Regulated Kinase* (MAPK/ERK) e della *Phosphatidylinositol 3-OH Kinase/Protein Kinase B* (PI3K/AKT), nonché nella produzione di secondi messaggeri come Ca^{2+} , adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e guanosina monofosfato ciclico (cGMP) (15, 20-22) (Figura 4).

L'attivazione di questi meccanismi "non genomici" può influenzare indirettamente anche l'espressione genica, suggerendo che le azioni nucleari e quelle non nucleari degli estrogeni siano strettamente integrate (23, 24).

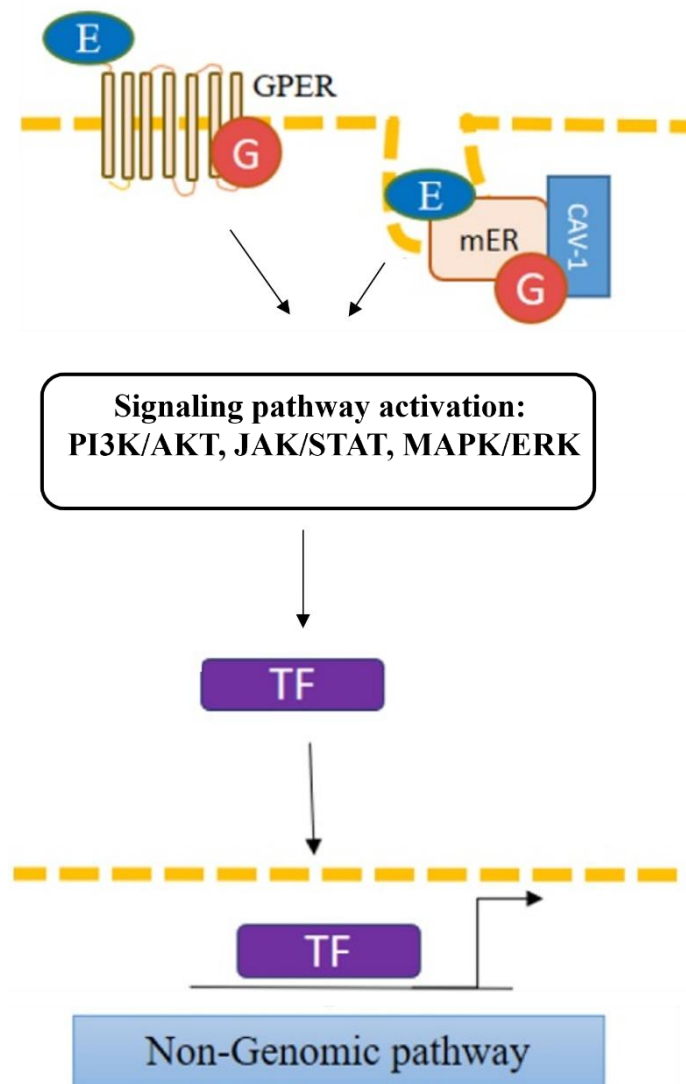
I recettori degli estrogeni localizzati sulla membrana plasmatica rappresentano il 5-10% del totale di ER nei diversi tipi cellulari (18). Tale percentuale comprende sia ER α che ER β , anche se l'espressione relativa delle due isoforme varia a seconda del tipo cellulare. Ad esempio, entrambe le isoforme sono state individuate sulla membrana delle cellule endoteliali

vascolari, dove mediano effetti rapidi degli estrogeni come la vasodilatazione, attraverso l'attivazione delle vie ERK e PI3K, con conseguente produzione di ossido nitrico (NO) che regola il tono della muscolatura liscia. In altri tipi cellulari, come le cellule di carcinoma mammario (25) e i linfociti umani (26) mostrano una maggiore espressione dell'isoforma ER α rispetto a ER β .

Il meccanismo con cui gli mER vengono traslocati in membrana rimane, ad oggi, poco conosciuto (18). Studi sperimentali hanno indicato che la palmitoilazione di specifici residui amminoacidici è necessaria per la loro traslocazione in membrana, dove si associano con le caveoline (22, 27, 28). Ad esempio Marino e collaboratori (29) hanno dimostrato che la cisteina 477 nel dominio E di ER α rappresenta un sito per la palmitoilazione che promuove l'associazione di ER con la caveolina-1.

La palmitoilazione riveste un ruolo importante anche nell'induzione dei segnali di trasduzione rapidi (21, 22, 30).

Oltre ai recettori tradizionali, gli estrogeni possono agire mediante recettori accoppiati alle proteine G. In particolare, il *G-Protein-Coupled Receptor 30* (GPCR30) è stato recentemente identificato come recettore in grado di legare gli estrogeni e di attivare rapidamente le vie di segnalazione PI3K e MAPK, contribuendo agli effetti "non genomici" degli estrogeni (31, 32).



González-Mora AM, et al. *Int J Mol Sci*, 2021

Figura 4. Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione non genomico di ER.

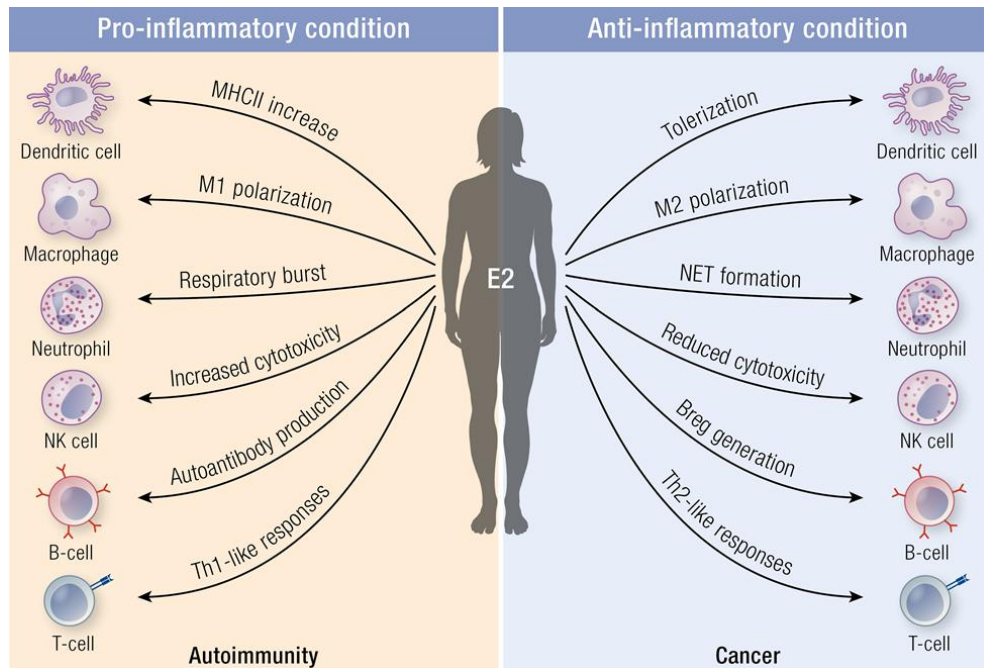
Il legame dell'E2 a mER e GPER induce l'attivazione di diverse vie di segnalazione che attivano enzimi e fattori di trascrizione, capaci di modulare la trascrizione di numerosi geni. cav, caveolina; ER, recettore degli estrogeni; G, recettore accoppiato a proteine G; GPER, recettore degli estrogeni accoppiato a proteine G; mER, *membrane estrogen receptors*; TF, fattori di trascrizione.

GLI ESTROGENI NELLA REGOLAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

Gli estrogeni svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della risposta immunitaria attraverso il loro legame con i recettori $ER\alpha$ ed $ER\beta$, espressi su diverse popolazioni di cellule immunitarie (11, 33-35). L'attivazione di tali recettori influenza molteplici processi biologici, tra cui la maturazione e la proliferazione cellulare, l'induzione dell'apoptosi e la modulazione della produzione di citochine e anticorpi (Figura 5). Gli estrogeni mediano risposte pro- e/o anti-infiammatorie che dipendono dalla concentrazione ormonale, dal tipo di recettore e cellula coinvolta e dal contesto fisiologico o patologico. Questi effetti spiegano, almeno in parte, le differenze di genere osservate nella risposta alle infezioni, ai vaccini e nella prevalenza delle malattie autoimmuni tendenzialmente più elevate nel sesso femminile.

Durante la gravidanza, i livelli di estrogeni — in particolare E2 ed E3 — aumentano in modo esponenziale, raggiungendo concentrazioni fino a 100–1000 volte superiori rispetto a quelle osservate nelle donne in età fertile non gravide (Tabella 1). Questo incremento, che diventa particolarmente marcato nel secondo e terzo trimestre, svolge un ruolo essenziale nella modulazione del sistema immunitario materno. Gli estrogeni in gravidanza esercitano, infatti, un effetto prevalentemente immunosoppressivo, necessario per garantire la tolleranza verso il feto che presenta antigeni paterni potenzialmente immunogeni. Attraverso l'induzione di un ambiente immuno-regolatorio — caratterizzato dal potenziamento delle cellule T regolatorie (Treg), dalla soppressione delle risposte T helper (Th)1 pro-infiammatorie e dalla modulazione dell'attività delle cellule NK dell'utero — gli estrogeni contribuiscono a creare condizioni favorevoli all'impianto dell'embrione e allo sviluppo della placenta. Tale assetto

immunologico, insieme ai cambiamenti endocrini e metabolici tipici della gravidanza, è fondamentale per prevenire risposte immunitarie eccessive che comprometterebbero l'impianto e la normale progressione della gestazione.



Chakraborty B, et al. *Endocrine Reviews*, 2023

Figura 5. Rappresentazione schematica degli effetti degli estrogeni sul sistema immunitario.

La figura illustra gli effetti immunomodulatori dell'E2 sul sistema immunitario che, si manifestano sia con azioni pro-infiammatorie sia anti-infiammatorie. In condizioni pro-infiammatorie, E2 può stimolare l'aumento dell'espressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di II classe nelle DC, potenziare la citotossicità delle cellule NK, promuovere la produzione di autoanticorpi contribuendo allo sviluppo di patologie autoimmuni. Al contrario, in contesti anti-infiammatori, E2 potrebbe indurre la tolleranza delle cellule dendritiche, stimolare la generazione di cellule B regolatorie (Breg) creando un microambiente immunosoppressivo che può facilitare la progressione tumorale. E2 = 17β-estradiolo, NET, *neutrophil extracellular traps*; NK = cellule natural killer; Th1, linfociti T helper 1; Th2, linfociti T helper 2.

Condizione fisiologica	pM
Fase follicolare precoce	73 – 294 pM
Fase follicolare tardiva / pre-ovulatoria	551 – 1.285 pM
Picco ovulatorio	551 – 2.753 pM
Fase luteale	110 – 1.652 pM
Gravidanza – I trimestre	3.670 – 25.690 pM
Gravidanza – II trimestre	11.010 – 73.400 pM
Gravidanza – III trimestre	29.360 – 146.800 pM
Post-menopausa	< 37 – 73 pM

Tabella 1. Concentrazioni indicative di 17 β -estradiolo (E2) espresse in pM.

Le cellule dell'immunità innata

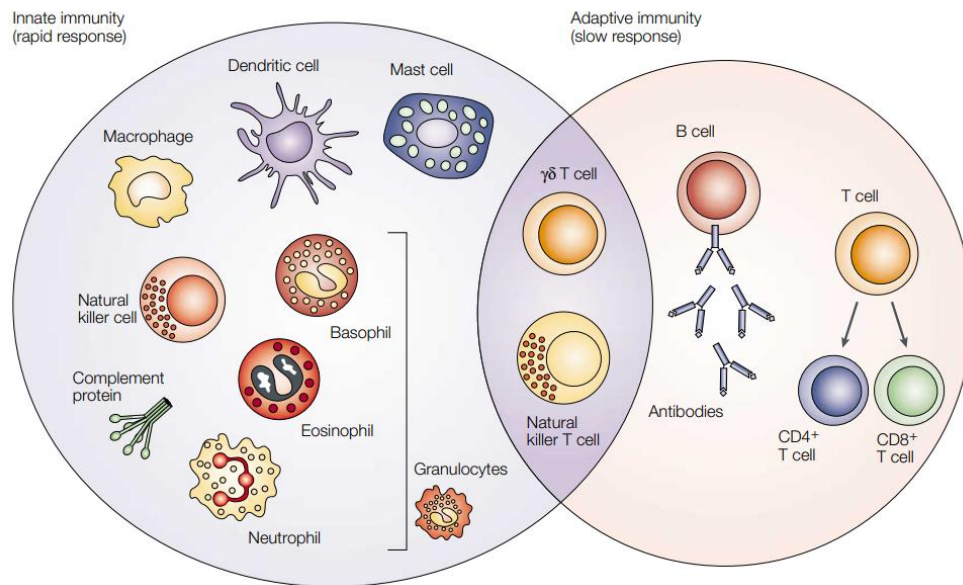
Il sistema immunitario innato rappresenta la prima linea di difesa dell'organismo contro agenti patogeni e danni tissutali. Si tratta di un meccanismo evolutivamente conservato, capace di riconoscere in modo rapido e aspecifico strutture molecolari caratteristiche dei microrganismi (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) o delle cellule danneggiate (*Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMPs), garantendo così una risposta protettiva immediata (36, 37).

Il riconoscimento dei PAMPs e/o dei DAMPs avviene tramite specifici recettori, detti *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), che includono i *Toll-like receptors* (TLRs), i *NOD-like receptors* (NLRs), i *RIG-I-like receptors* (RLRs) e la via cGAS–STING, coinvolta nella risposta al DNA citosolico (38, 39). L'attivazione dei PRRs innesca una cascata di segnali intracellulari che porta all'attivazione di fattori di trascrizione come *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) e AP-1, promuovendo la produzione di citochine pro-infiammatorie, interferoni di tipo I (IFN-I) e molecole effettrici antivirali (40).

Le principali risposte effettrici dell'immunità innata includono la fagocitosi, l'attivazione del sistema del complemento, la produzione di citochine e chemochine infiammatorie (41). La regolazione di questi meccanismi è fondamentale per mantenere l'omeostasi della risposta immunitaria mentre la loro disregolazione può determinare infiammazione cronica e contribuire allo sviluppo di patologie autoimmuni (42). A differenza della risposta adattativa, l'immunità innata non genera memoria antigenica specifica, anche se negli ultimi anni è stato dimostrato che alcune popolazioni di cellule innate possono sviluppare una forma di "memoria addestrata"

(*trained immunity*), che promuove una risposta più efficiente a stimoli successivi, anche non correlati al patogeno iniziale (43).

Le principali cellule effettrici dell'immunità innata includono cellule fagocitiche (macrofagi, monociti e neutrofili), DC, NK e granulociti (basofili, eosinofili, mastociti) (Figura 5).



Dranoff G, *Nature Reviews | Cancer*, 2024

Figura 5. La risposta immunitaria innata e adattativa.

La risposta immunitaria innata rappresenta la prima linea di difesa dell'organismo contro le infezioni causate da microrganismi patogeni. Essa comprende fattori solubili, come le proteine del complemento, e diverse popolazioni cellulari, tra cui granulociti (neutrofili, eosinofili e basofili), mastociti, macrofagi, cellule dendritiche e cellule NK. Il sistema immunitario adattativo, invece, si attiva più lentamente generando una risposta altamente specifica e duratura, mediata principalmente dagli anticorpi, dalle cellule B e dai linfociti T CD4⁺ e CD8⁺. Le cellule T natural killer (NKT) e le cellule T $\gamma\delta$ si collocano a cavallo tra l'immunità innata e l'immunità adattativa. Tali cellule costituiscono il ponte di collegamento tra le due risposte, contribuendo alla regolazione dei due sistemi.

Cellule fagocitiche

Le cellule fagocitiche sono cellule del sistema immunitario, come monociti, macrofagi e neutrofilo che ingeriscono e distruggono microrganismi, detriti cellulari e altri elementi estranei attraverso un processo chiamato fagocitosi. Questo processo è fondamentale per la difesa dell'organismo contro le infezioni e per il mantenimento dell'omeostasi tissutale.

I monociti sono cellule chiave della risposta immunitaria innata, derivanti da precursori ematopoietici del midollo osseo e successivamente rilasciati nel sangue, per essere reclutati nei tessuti (44, 45). L'identificazione dei marcatori di superficie cellulare ha permesso di individuare diverse sottopopolazioni in base all'espressione relativa di CD14 [co-recettore per il recettore TLR4 e la segnalazione LPS-mediata] e CD16 (recettore Fc γ IIIa) (46): i) monociti classici mostrano un'elevata espressione di CD14 ma nessuna espressione di CD16 (CD14⁺⁺ CD16⁻), ii) monociti intermedi mostrano un alto livello di CD14 e un basso livello di CD16 (CD14⁺⁺ CD16⁺), e iii) monociti non classici esprimono un basso livello di CD14 ma un alto livello di CD16 (CD14⁺ CD16⁺⁺).

Sia in condizioni fisiologiche che patologiche, ciascuna sottopopolazione svolge funzioni effettrici distinte (47). I monociti classici sono coinvolti nel processo di riparazione dei tessuti e nella risposta immunitaria, hanno capacità fagocitica (46), possono promuovere risposte infiammatorie, grazie alla loro capacità di esprimere proteine pro-infiammatorie (48). I monociti intermedi sono responsabili della proliferazione e della stimolazione delle cellule T. Esprimono livelli più elevati di molecole MHC di II classe, coinvolto nella presentazione di antigeni ai linfociti T (46). I monociti non classici sono coinvolti nella risposta a danni o infiammazione. È stata infatti

osservata una più alta espressione di geni coinvolti nel riarrangiamento del citoscheletro, a conferma del loro ruolo di cellule sentinella (47, 49).

I macrofagi svolgono ruoli importanti nello sviluppo dei tessuti, nell'omeostasi e nella difesa dell'ospite (50). La maggior parte dei macrofagi derivano da precursori embrionali mentre altri, derivano da monociti provenienti dal midollo osseo. In risposta agli stimoli infiammatori, la proliferazione dei macrofagi residenti e il reclutamento dei macrofagi differenziati dai monociti concorrono all'accumulo dei macrofagi nei tessuti (51). Una volta reclutati, i macrofagi possono assumere diversi fenotipi funzionali. Il fenotipo pro-infiammatorio definito M1 è indotto da citochine Th1 come IFN- γ , interleuchina (IL)-2 e fattore di necrosi tumorale (TNF)- α , o da componenti microbiche come LPS batterici. I macrofagi M1 producono alti livelli di citochine pro-infiammatorie come IL-12, IL-23, TNF- α , IL-6 e IL-1 (52). Il fenotipo anti-infiammatorio, definito M2 è indotto da citochine Th2 come IL-4 e IL-13, con conseguente produzione di IL-10 e *Transforming Growth Factor-beta* (TGF)- β . I macrofagi M2 sono coinvolti nel riparo del danno tissutale e nella risoluzione dell'infiammazione locale (53).

I macrofagi rivestono un ruolo cruciale nella progressione dei tumori. Numerosi studi hanno evidenziato che la presenza di macrofagi associati al tumore (TAM) è correlata a una prognosi sfavorevole, in quanto favorisce la crescita neoplastica (54, 55), l'angiogenesi e la formazione di metastasi (56).

I neutrofili, primi leucociti reclutati nei siti di infezione o lesione, sono coinvolti nell'eliminazione dei patogeni attraverso fagocitosi, rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e formazione di trappole extracellulari (*neutrophil extracellular traps*, NETs), strutture fibrillari di cromatina/DNA decondensate, che intrappolano fisicamente i patogeni e impediscono loro

(o ai detriti cellulari) di lasciare il sito della lesione (57). In condizioni fisiologiche, i neutrofili derivano dai progenitori mieloidi nel midollo osseo e attraversano una serie di fasi maturative (pro-mielociti, mielociti, metamielociti con nuclei ad anello e cellule a banda) prima di diventare neutrofili maturi (58). Quest'ultimi, una volta attivati, rilasciano fattori pro-infiammatori (come $TNF-\alpha$), aumentano la produzione di ROS e inducono apoptosi attraverso l'attivazione di *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL) (59).

Cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (DC) rappresentano una piccola percentuale della popolazione immunitaria. Sono cellule presentanti l'antigene (APC) altamente specializzate, essenziali per l'inizio e nel mantenimento delle risposte immunitarie grazie alla loro capacità di catturare gli antigeni, processarli e presentarli sotto forma di complessi peptide-MHC alle cellule T. Le DC immature sono altamente specializzate nell'acquisizione dell'antigene tramite pinocitosi, endocitosi mediata da recettori e fagocitosi. Gli antigeni internalizzati vengono processati e presentati in associazione a molecole MHC di I o II classe attivando rispettivamente cellule T $CD4^+$ e $CD8^+$ (60-63).

La maturazione delle DC, indotta da PAMPs, DAMPs e mediatori infiammatori (64), comporta un'up-regolazione dell'espressione delle molecole MHC, delle molecole costimolatorie (CD80 e CD86) e della glicoproteina della superfamiglia Ig di tipo I (CD83), oltre che la riorganizzazione dei compartimenti intracellulari e la migrazione verso gli organi linfoidi secondari (65). Questo processo è accompagnato dall'induzione del recettore per le chemochine CCR7 sulle DC, che in presenza dei suoi ligandi CCL19 [nota anche come chemochina ligando

EBI1 (ELC) e CCL21 [nota anche come *Secondary Lymphoid-tissue Chemokine* (SLC)] guida le DC verso le zone T-dipendenti dei linfonodi, dove avviene l'attivazione delle cellule T. L'interazione DC-cellula T richiede il riconoscimento del complesso peptide-MHC e segnali costimolatori (CD40, CD80, CD86), ed è ulteriormente amplificata da un circuito bidirezionale in cui le cellule T CD4⁺ attivate potenziano la funzione delle DC favorendo risposte T antigene-specifiche (65, 66).

Esistono 4 sottotipi principali di DC: 1) DC convenzionali di tipo 1 (cDC1) 2) e di tipo 2 (cDC2) 3) DC plasmacitoidi (pDC), e 4) le cellule dendritiche derivate da monociti (Mo-DC), ognuna con funzioni effettrici uniche (60).

Le cDC1 si caratterizzano per l'elevata espressione di CD141, CD13 e CD33, e da una bassa espressione di CD11c e CD11b. Le cDC1 umane si trovano nel sangue, negli organi linfoidi (67, 68) e nei tessuti non linfoidi, come pelle, polmoni, intestino e fegato (62, 69). Hanno un'elevata capacità di presentare l'antigene ai linfociti T mediante l'MHC di I classe, favorire l'attivazione delle cellule T CD8⁺ e promuovere le risposte Th1 e NK attraverso la produzione di IL-12 (70, 71).

Le cDC2, ampiamente distribuite nel sangue, nei tessuti e negli organi linfoidi, si caratterizzano per l'espressione di molecole come CD1c, CD11b, CD13 e CD33. Le cDC2 dermiche presentano anche l'espressione della molecola CD1a. Le cDC2 esprimono alti livelli di recettori PRRs, come TLR, NLR e RLR, suggerendo la loro capacità di presentazione di antigeni batterici come LPS e flagellina. Inoltre, grazie all'espressione di molecole CD1c e CD1a, sono in grado di presentare antigeni di natura glicolipidica tipica dei micobatteri, suggerendo un ruolo nel riconoscimento fungino. Le cDC2 umane secernono alti livelli di IL-12, IL-23, IL-1, IL-8 e IL-10 ma bassi

livelli di IFN di tipo III, e sono coinvolte nell'attivazione delle cellule T CD4⁺ e sottogruppi funzionali (72).

Le pDC si caratterizzano per l'espressione di molecole come CD123, CD45RA, CD4 e vari recettori coinvolti nella produzione di IFN-I come CD303, CD85 e DR6. Le pDC sono cellule specializzate nel rilevamento dell'acido nucleico virale mediante i recettori TLR7 e TLR9 con conseguente produzione di IFN di tipo I e di tipo III oltre che di citochine come TNF- α e IL-6. (73). Questa risposta induce aumento della citotossicità delle cellule NK (74) e delle cellule T (75), e potenziamento dell'attività fagocitica dei macrofagi (76).

Nelle malattie autoimmuni, come il lupus eritematoso sistemico (LES), l'attivazione di TLR7 e TLR9 nelle pDC induce la produzione di IFN-I, contribuendo all'esacerbazione della risposta autoimmune (77-79).

Nel topo, le Mo-DC rappresentano una popolazione eterogenea di cellule mieloidi che si differenzia da monociti circolanti CD14^{hi}. La loro identificazione è stata storicamente complessa a causa della sovrapposizione fenotipica con macrofagi e con sottopopolazioni di cDC CD11b⁺, in particolare nei modelli murini (80).

Dal punto di vista funzionale, le Mo-DC si distinguono dalle cDC convenzionali per la capacità di esercitare la loro funzione principalmente nei siti periferici di infiammazione piuttosto che nei tessuti linfoidi secondari.

Le Mo-DC possono essere generate *in vitro* in presenza di *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) e IL-4, nonché di stimoli attivanti quali il lipopolisaccaride (LPS). Dal punto di vista fenotipico, queste cellule presentano la tipica morfologia delle DC ed esprimono elevati livelli di molecole MHC di I e II classe, CD1, Fc γ RII,

CD40, B7, CD44 e ICAM-1, risultando negative per CD14. Dal punto di vista funzionale, le Mo-DC generate *in vitro* mostrano un'elevata capacità di cattura e processazione dell'antigene, una caratteristica propria delle DC immature *in vivo*, e risultano efficaci nell'attivazione delle cellule T in una MLR (81).

Natural killer

Le cellule NK sono cellule della linea linfoide, caratterizzate dalla capacità di riconoscere e distruggere cellule infettate da virus o trasformate con un meccanismo MHC-indipendente, esercitando un'azione citotossica mediata dal rilascio di perforine e granzimi (82). Le cellule NK si caratterizzano per l'espressione delle molecole CD56^{dim} e CD16^{hi} e dall'assenza del recettore per le cellule T (TCR) e della molecola CD3. Il recettore NKp46 è un marcatore utile per individuare cellule NK circolanti e tissutali sia nell'uomo che nel topo (83). Le cellule NK risiedono in numerosi tessuti, tra cui intestino, fegato e polmoni. La maturazione delle NK prevede vari stadi: nel topo, ad esempio, in base all'espressione di CD11b e CD27, possono essere individuati 3 stadi di maturazione: NK immature CD27⁺CD11b, NK di transizione CD27⁺CD11b⁺ e NK mature CD27⁻CD11b⁺. Nell'uomo, gli stadi di maturazione includono lo stadio CD56^{bright} (stadio immaturo) e lo stadio CD56^{dim} (stadio maturo), entrambi producono citochine infiammatorie e contribuiscono alla modulazione della risposta immunitaria (84).

Granulociti

I granulociti costituiscono una componente essenziale del sistema immunitario innato e rappresentano la popolazione leucocitaria più abbondante nel sangue periferico (85, 86). Il loro nome deriva dalla presenza di granuli citoplasmatici ricchi di enzimi idrolitici, proteine

antimicrobiche e mediatori bioattivi che partecipano alla difesa contro patogeni e alla regolazione della risposta infiammatoria.

In base alle caratteristiche morfologiche e funzionali, i granulociti si suddividono in mastociti, basofili ed eosinofili, ciascuno dotato di meccanismi d'azione distinti ma interconnessi (87, 88).

Tutti derivano da progenitori mieloidi nel midollo osseo e, in seguito a stimoli infiammatori o infettivi, vengono rapidamente reclutati nei tessuti periferici. Molecole come alarmino (IL-25, IL-33, TSLP) e chemochine (CXCL1, CCL11) prodotte da cellule epiteliali o immunitarie ne guidano il richiamo nei siti di infezione o danno tissutale (89, 90).

I mastociti e i basofili condividono numerose caratteristiche strutturali e funzionali, ed entrambi sono centrali nell'innescare delle risposte infiammatorie acute, come asma e reazioni allergiche. I mastociti, presenti soprattutto nel tessuto connettivo perivascolare e nelle mucose, agiscono come cellule sentinella capaci di rilasciare rapidamente citochine, istamina e proteasi in risposta a infezioni o danni tissutali (91, 92). I basofili sono circolanti nel sangue dove contribuiscono all'attivazione della risposta T di tipo Th2 attraverso la secrezione di IL-4 e IL-13 (86).

Gli eosinofili, infine, sono granulociti con moderata capacità fagocitica, specializzati nella difesa contro organismi pluricellulari troppo grandi per essere eliminati mediante fagocitosi (elminti). Rilasciano proteine cationiche citotossiche e contribuiscono, insieme a mastociti e basofili, alla patogenesi delle reazioni allergiche e dell'asma bronchiale (93).

Le cellule dell'immunità adattativa

L'immunità adattativa costituisce una componente essenziale del sistema immunitario che si attiva quando le difese innate non sono sufficienti a controllare l'invasione di patogeni o altri agenti dannosi. Le funzioni principali della risposta immunitaria adattativa sono: i) il riconoscimento di specifici antigeni "*non self*"; ii) la generazione di risposte immunitarie volte ad eliminare specifici patogeni; e iii) lo sviluppo di una memoria immunologica (85, 94, 95).

Mentre l'immunità innata si è evoluta per riconoscere ed eliminare rapidamente un'ampia gamma di patogeni, la straordinaria variabilità delle strutture antigeniche e la capacità dei microrganismi di mutare per eludere la risposta immunitaria hanno favorito l'evoluzione del sistema immunitario adattativo. A differenza della risposta innata, la risposta adattativa è mediata da specifici recettori dei linfociti T (TCR) e dei linfociti B (BCR/anticorpi), generati tramite ricombinazione genica, che consentono il riconoscimento di una vasta gamma di antigeni, rendendo la risposta immunitaria altamente specifica, flessibile e mirata.

Dopo il primo incontro con un antigene, una parte delle cellule attivate persiste nell'organismo, costituendo la popolazione di cellule della memoria (memoria immunologica). Questa popolazione cellulare consente di eliminare rapidamente un patogeno specifico in caso di infezioni successive (85).

Le cellule effettrici del sistema immunitario adattativo comprendono i linfociti T, principali mediatori della risposta immunitaria cellulare, che maturano nel timo, e i linfociti B, responsabili della produzione di anticorpi, che si sviluppano nel midollo osseo, mediatori della risposta immunitaria umorale (94, 95).

Dopo la maturazione negli organi linfoidei primari (timo e midollo osseo), i linfociti migrano verso gli organi linfoidei secondari (linfonodi e milza), e una volta attivati, migrano nei tessuti in cui devono esercitare la loro funzione effettrice, grazie a specifiche molecole di adesione e di recettori per le chemochine, come CCR4 (85, 95).

Linfociti T

I linfociti T derivano dalle cellule staminali emopoietiche del midollo osseo e completano la loro maturazione nel timo. Ogni linfocita T presenta sulla propria membrana uno specifico *T cell receptor* (TCR), unico per ciascuna cellula, e in seguito ad attivazione mediata da specifici segnali, è in grado di proliferare e differenziarsi.

I linfociti T necessitano della cooperazione delle cellule APC (DC, macrofagi, linfociti B) per riconoscere un antigene specifico. Le APC espongono sulla loro superficie le molecole MHC di I classe, che presentano peptidi derivati da proteine intracellulari e molecole MHC di II classe, che presentano peptidi provenienti da proteine extracellulari (85, 95).

Durante lo sviluppo del sistema immunitario, i linfociti T che riconoscono antigeni "*self*" presentati dalle APC in associazione con il complesso MHC vengono eliminati. Il processo di eliminazione dei linfociti T può avvenire tramite selezione negativa nel timo o mediante selezione periferica. Entrambi i meccanismi garantiscono la tolleranza immunologica al fine di prevenire l'insorgenza di malattie autoimmuni (96, 97). Diversamente, i linfociti T che riconoscono mediante il TCR il complesso MHC-antigene "*non self*" vengono attivati e si differenziano in CTL (linfociti CD8⁺) o in linfociti T helper (linfociti CD4⁺) (98, 99). I CTL sono coinvolti nell'uccisione delle cellule infettate da agenti patogeni e delle cellule tumorali. L'espansione clonale delle CTL promuove il rilascio di sostanze che

inducono l'uccisione delle cellule bersaglio. Dopo la risoluzione dell'infezione, una parte delle cellule effettrici verrà eliminata attraverso fagocitosi, mentre l'altra si differenzierà in cellule della memoria, pronte a riattivarsi e differenziarsi in cellule effettrici in caso di un successivo incontro con lo stesso antigene.

Le cellule T helper svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta immunitaria, coordinando e indirizzando l'attività di altre cellule del sistema immunitario. Una volta attivate si differenziano in diversi sottotipi — Th1, Th2, Th17 e linfociti Treg — ciascuno caratterizzato da specifiche funzioni effettrici (94, 100, 101).

La risposta di tipo Th1 è principalmente mediata dalla produzione di IFN- γ , una citochina chiave che stimola l'attività microbica dei macrofagi e citotossica delle NK e dei CTL, potenzia l'immunità antivirale e quella diretta contro patogeni intracellulari (102). Le citochine secrete dalle cellule Th1 favoriscono, inoltre, il differenziamento delle cellule B in plasmacellule produttrici anticorpi opsonizzanti, che facilitano il riconoscimento e la fagocitosi dei microrganismi da parte delle cellule fagocitiche (94, 100).

Tuttavia, una risposta Th1 eccessiva o deregolata è associata all'insorgenza di diverse patologie autoimmuni, in cui l'attivazione immunitaria si rivolge contro componenti *self* (103-105).

La risposta Th2, invece, è caratterizzata dalla secrezione di citochine come IL-4, IL-5 e IL-13, coinvolte nello sviluppo delle cellule B produttrici di immunoglobuline di classe E (IgE) e nel reclutamento di mastociti ed eosinofili. Queste cellule sono importanti per la difesa dell'organismo contro parassiti extracellulari. Inoltre, la risposta Th2 promuove la produzione di particolari isotipi di IgG, utili nel contrastare le infezioni batteriche (94, 100, 102).

Un'eccessiva polarizzazione verso il fenotipo Th2, e conseguente iperproduzione delle relative citochine, è frequentemente associata a patologie atopiche, incluse allergie e malattie asmatiche (106, 107).

Le cellule Th17, descritte più recentemente, si caratterizzano per la produzione di citochine appartenenti alla famiglia IL-17, implicate nell'induzione e nel mantenimento delle risposte infiammatorie (94, 100, 102). Svolgono un ruolo cruciale nella difesa contro patogeni extracellulari e fungini, ma un'eccessiva o persistente attività Th17 si correla a diverse malattie infiammatorie croniche e autoimmuni (103, 105).

Un sottogruppo di cellule T CD4⁺, denominato cellule Treg, svolge un ruolo essenziale nella modulazione e nel controllo della risposta immunitaria. Le Treg limitano l'eccessiva attività del sistema immunitario attraverso meccanismi di soppressione cellulare e citochinica, contribuendo alla prevenzione delle risposte autoimmuni e al mantenimento dell'omeostasi immunologica. Esse partecipano, inoltre, alla risoluzione delle risposte infiammatorie una volta eliminato l'antigene e sono fondamentali per l'instaurarsi della tolleranza immunologica periferica (94, 100-102).

I linfociti T Natural Killer invariati (iNKT), rappresentano un nuovo sottogruppo di linfociti T che presentano caratteristiche sia del sistema immunitario innato che di quello adattativo. Le iNKT, che rappresentano solo lo 0,1% delle cellule T circolanti nel sangue periferico, esprimono un recettore TCR invariante e marcatori di superficie tipici delle cellule NK, come CD161/CD56 nell'uomo e NK1.1 nel topo. Le iNKT sono in grado di riconoscere antigeni lipidici e di rispondere rapidamente agli stimoli immunitari, fungendo da ponte funzionale tra immunità innata e adattativa (108-111).

La popolazione di NKT si suddivide in due principali sottotipi: i) le cellule NKT di tipo I o iNKT, che esprimono un TCR invariante ($V\alpha 14J\alpha 18$ associato a $V\beta 8.2$, $V\beta 7$ o $V\beta 2$ nel topo; $V\alpha 24J\alpha 18$ associato a $V\beta 11$ nell'uomo) e rispondono all'antigene lipidico α -galattosylceramide (α -GalCer) presentato dalle molecole CD1d non polimorfica facente parte della famiglia CD1; ii) le cellule NKT di tipo II, più eterogenee, caratterizzate da una maggiore variabilità nel TCR e da una specificità antigenica distinta. Entrambi dipendono dalla selezione mediata dalla molecola CD1d durante lo sviluppo timico, ma differiscono per funzioni effettrici, profili citochinici e ruoli immunoregolatori (108-111).

Le cellule iNKT, in particolare, sulla base dell'espressione delle molecole CD4 e CD8 e del loro profilo citochinico, si differenziano in quattro sottopopolazioni: i) $CD4^+CD8^-$, associate nell'uomo a risposte immunitarie di tipo Th0 (caratterizzate dal rilascio di citochine sia di tipo Th1 che Th2); ii) $CD4^-CD8^-$ (o *Double Negative*, DN), che mostrano un chiaro profilo citochinico di tipo Th1; iii) $CD4^+CD8^+$ (o *Double Positive*, DP), cellule immature che esprimono già il recettore TCR, ma che non hanno ancora superato la fase di selezione positiva timica; iv) $CD4^-CD8^+$ che sembra abbiano funzioni citolitiche e di soppressione sulla proliferazione e l'espansione delle cellule T attivate (112, 113).

Pertanto, le cellule iNKT si distinguono per la capacità di esercitare funzioni sia pro-infiammatorie che regolatorie, modulando l'esito di numerose condizioni patologiche, tra cui infezioni, infiammazioni croniche e patologie autoimmuni (110, 114-116).

Anche i linfociti T $\gamma\delta$, come le iNKT, condividono numerose caratteristiche con le cellule dell'immunità innata. Presentano un repertorio limitato di

TCR, non ristretto all'MHC, e uno stato di pre-attivazione che consente risposte rapide indipendenti dal *priming* antigenico.

Le cellule T $\gamma\delta$ possono essere attivate da PAMPs, DAMPs o da citochine anche in assenza di ligandi specifici per il TCR. Nell'uomo rappresentano circa l'1-10% dei linfociti circolanti, con fenotipo prevalentemente CD4⁺/CD8⁻, e sono abbondanti nei tessuti epiteliali, in particolare nell'intestino, dove contribuiscono al mantenimento delle barriere mucosali. Analogamente alle cellule T, le cellule T $\gamma\delta$ svolgono un ruolo di prima linea nella difesa immunitaria, esercitando una spiccata attività citotossica e producendo diverse chemochine e un'ampia gamma di citochine, tra cui IFN- γ , TNF- α e IL-17, IL-21 e IL-22.

In risposta alle infezioni, il loro numero può aumentare rapidamente sia localmente sia a livello sistemico, generando risposte effettrici precoci simili a quelle dell'immunità innata. Sebbene svolgano un ruolo protettivo nei confronti dei patogeni, le cellule T $\gamma\delta$ sono anche coinvolte nella patogenesi di malattie autoimmuni, evidenziando una duplice funzione nella regolazione della risposta immunitaria (117-119).

Linfociti B

I linfociti B sono componenti essenziali della risposta immunitaria adattativa responsabili dell'immunità umorale. La loro origine risiede nelle cellule staminali emopoietiche presenti nel midollo osseo dove attraversano diverse fasi di differenziazione e maturazione. Durante il processo di maturazione, le cellule B acquisiscono in membrana un recettore specifico *B cell receptor* (BCR) unico per ciascuna cellula, che consente l'interazione diretta con l'antigene e la produzione di anticorpi (120, 121).

L'attivazione ottimale delle cellule B dipende dall'integrazione del segnale del BCR con co-recettori come CD19, CD21, CD81 e CD225, e da segnali co-stimolatori forniti dall'interazione con le cellule T helper, che coinvolgono molecole come B7 (su CD19/CD20) e CD40 (122-124). Questa interazione è cruciale nell'iper-mutazione somatica e nel cambio di classe ("*switch*" isotipico) (123).

Quando un linfocita B riconosce un antigene specifico per il proprio recettore, si attiva e si differenzia in plasmacellule o in cellule della memoria. Le plasmacellule sono cellule a vita breve che producono grandi quantità di anticorpi circolanti, fornendo protezione immediata contro i patogeni. Le cellule B della memoria, invece, sono cellule a lunga sopravvivenza che conservano il recettore specifico e garantiscono una risposta secondaria rapida e potente in caso di riesposizione allo stesso antigene (95, 125).

L'attivazione delle cellule B può essere dipendente o indipendente dal timo. La risposta T-indipendente è diretta contro antigeni non proteici, come componenti della parete cellulare di alcuni batteri (ad es. LPS) o antigeni contenenti molecole altamente ripetute (ad es. flagellina batterica). L'attivazione dei linfociti B avviene attraverso il legame diretto

dell'antigene con il BCR e mediante segnali aggiuntivi provenienti dai recettori PRRs, come TLRs. La risposta porta alla produzione di anticorpi di tipo IgM, con bassa affinità per l'antigene, e non produce cellule di memoria (120).

Nella risposta T-dipendente, le cellule T helper CD4⁺ interagiscono con le cellule B attraverso molecole di superficie come MHC di II classe, CD40/CD40L e molecole co-stimolatrici (es. B7-CD28), oltre a rilasciare citochine come IL-4, IL-6 e IL-10, che regolano la differenziazione e la classe di anticorpi prodotti (123).

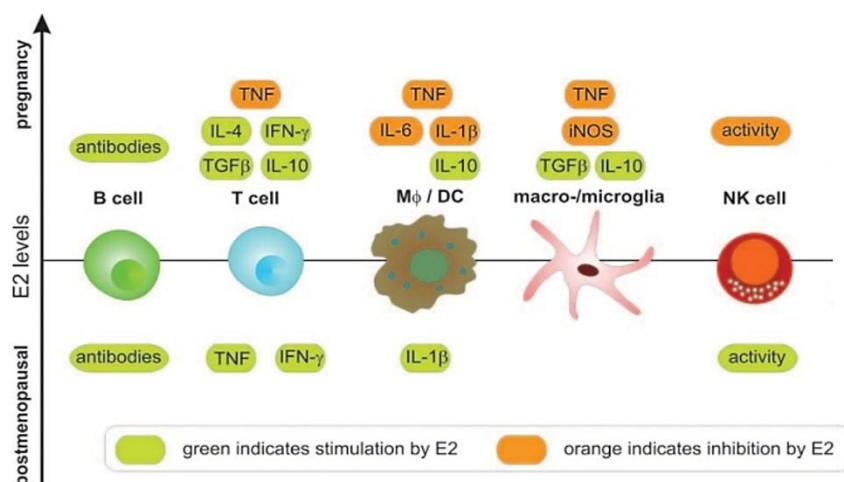
Gli anticorpi riconoscono e neutralizzano i patogeni extracellulari attraverso diversi meccanismi: i) l'attivazione del sistema del complemento, che determina la lisi del microrganismo o la rimozione dei complessi immuni; ii) l'opsonizzazione, che facilita la fagocitosi; e iii) la neutralizzazione di tossine e virus, che impedisce il loro legame con le cellule bersaglio (85, 126). Dopo l'eliminazione del patogeno, i complessi antigene-anticorpo devono essere eliminati per evitare che possano depositarsi nelle pareti dei vasi sanguigni o in altri tessuti, e causare vasculiti, glomerulonefriti, artriti e malattie autoimmuni (127).

La tolleranza immunologica nei confronti degli autoantigeni è mantenuta attraverso meccanismi centrali (nel midollo osseo) e periferici. Le cellule B che riconoscono antigeni *self* vengono eliminate o inattivate tramite fenomeni di anergia o delezione clonale (128).

Un particolare sottogruppo di cellule B, le cellule B regolatorie (Breg), contribuisce al mantenimento dell'omeostasi immunitaria e alla prevenzione delle risposte infiammatorie eccessive mediante la secrezione di IL-10 e altre citochine immunomodulatorie.

Ruolo degli estrogeni nella regolazione della risposta immunitaria

Gli ormoni sessuali, e in particolare gli estrogeni, svolgono un ruolo cruciale nella modulazione del sistema immunitario. Il loro legame con ER α e ER β , recettori espressi dalla maggior parte delle cellule del sistema immunitario, media effetti pro- o anti-infiammatori a seconda della concentrazione ormonale, del tipo cellulare coinvolto e dello stato fisiologico (ad esempio gravidanza o menopausa) (11, 33-35). Numerose evidenze, infatti, indicano che gli estrogeni influenzano la proliferazione, la differenziazione e la funzione delle cellule immunitarie, modulando la risposta infiammatoria e contribuendo a spiegare le differenze di genere osservate nella prevalenza di alcune malattie autoimmuni e infettive (Figura 7) (33, 129).



Straub RH, *Endocrine review*, 2007

Figura 7. Influenza degli estrogeni su importanti vie pro-infiammatorie e anti-infiammatorie in diversi tipi di cellule.

Sull'asse y è indicata la concentrazione di estrogeni. A seconda della concentrazione di estrogeni, i fattori nelle caselle verdi sono stimolati, mentre quelli nelle caselle arancioni sono inibiti dagli estrogeni. DC, cellula dendritica; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; M, monocita/macrofago; NK, cellula natural killer.

Per quanto riguarda l'immunità innata è stato osservato che gli estrogeni modulando processi quali l'apoptosi, la produzione di citochine, la fagocitosi e la chemiotassi.

In particolare, nei monociti, gli estrogeni regolano l'apoptosi aumentando l'espressione della proteina pro-apoptotica FasL e regolando la produzione di citochine in modo dose-dipendente. A concentrazioni elevate (come durante la gravidanza) gli estrogeni riducono la produzione di IL-1 β , IL-6 e TNF- α , mentre a basse concentrazioni (tipiche della menopausa) incrementano tale produzione (130). In aggiunta, è stato osservato che gli estrogeni sono in grado di influenzare la differenziazione e la polarizzazione M1/M2. Studi *in vivo* hanno mostrato che l'E2 inibisce l'espressione del M-CSF e regola, di conseguenza, il reclutamento dei macrofagi nei siti infiammatori o microambiente tumorale (131, 132).

Nei modelli murini di endometriosi, ad esempio, è stato visto che E2 è in grado di aumentare l'espressione di CCL2, promuovendo il richiamo di macrofagi nella sede della lesione (133). Inoltre, la segnalazione estrogenica promuove la polarizzazione M2 attraverso l'attivazione di STAT3 e l'aumento della produzione di IL-10, favorendo così processi di riparazione tissutale e immunoregolazione (134).

I neutrofili rappresentano un ulteriore *target* degli estrogeni. L'E2 può sia stimolare che inibire l'attivazione dei neutrofili, influenzando processi come la NETosi, la produzione di ROS e la chemiotassi. Ad esempio, durante la gravidanza o in modelli di infiammazione acuta, l'E2 e il tamoxifene possono aumentare la formazione di NET (129).

Nel microambiente tumorale, l'E2 promuove il reclutamento di neutrofili pro-tumorigenici, favorendo la secrezione di TGF- β e la diffusione

metastatica, mentre l'uso di antagonisti di ER α come il *fulvestrant* riduce l'infiltrato neutrofilo e la progressione tumorale (135).

A livello delle DC, l'E2 promuove la maturazione delle DC e la produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-12 e IFN- γ nelle cDC, mentre nelle pDC stimola la secrezione di IFN- α (35).

Le NK, fondamentali per l'immunità antivirale e antitumorale, sono anch'esse sensibili all'azione degli estrogeni. Durante la gravidanza, ad esempio, la loro attività citotossica diminuisce con l'aumentare dei livelli di E2, fenomeno osservato anche con l'uso di contraccettivi orali (129, 136).

Esperimenti *in vitro* hanno mostrato che l'E2 riduce l'espressione di IFN- γ e aumenta quella di recettori inibitori come CD94, mentre il blocco dei recettori estrogenici ripristina la funzione citotossica, suggerendo che l'E2 è in grado di modulare l'immunità antitumorale mediata dalle NK (35).

Per quanto riguarda l'immunità acquisita, è stato visto che gli estrogeni possono regolare la funzione dei linfociti T e B (5, 35, 137, 138).

È noto che gli estrogeni influenzano la biologia dei linfociti T sin dalle fasi timiche di sviluppo fino alla modulazione delle loro funzioni effettrici. Durante lo sviluppo timico, l'esposizione agli estrogeni può condurre a un arresto della maturazione dei timociti: è stato infatti, dimostrato che il trattamento con gli estrogeni riduce la cellularità timica, favorendo la differenziazione del fenotipo CD4⁺/CD8⁻ a discapito della popolazione DN e/o DP (139). A livello periferico, invece, gli estrogeni sono in grado di modulare l'equilibrio tra le sottopopolazioni di linfociti T helper. Sembra che gli estrogeni favoriscano la generazione di cellule T regolatorie. È stato, infatti, osservato che alti livelli di E2 aumentano l'espressione del gene FoxP3 e incrementano la frequenza e la funzione delle Treg nei modelli murini e in gravidanza. Al tempo stesso, l'E2 può

influenzare l'equilibrio Th1/Th2 in maniera dose-dipendente: bassi livelli (menopausa) tendono a promuovere la risposta Th1 (con produzione di IFN- γ e attività citotossica dei CD8⁺) favorendo l'immunità cellulo-mediata, mentre alti livelli (gravidanza) favoriscono la polarizzazione Th2, con aumento di IL-4, IL-10 e un profilo più "tollerogenico" (33, 140). Inoltre, anche l'espressione di recettori per chemochine e di geni coinvolti nella migrazione linfocitaria può essere modulata da E2, influenzando, di conseguenza, la capacità dei linfociti T di rispondere agli antigeni e di migrare nei siti di infiammazione.

Questo equilibrio è particolarmente evidente in gravidanza, durante la quale l'aumento degli estrogeni induce uno stato immunologico tollerogenico, caratterizzato da elevati livelli di IL-10 e TGF- β , e da una riduzione delle citochine pro-infiammatorie (IL-12, IFN- γ , TNF- α). Tale adattamento è essenziale per la tolleranza fetale, ma al contempo aumenta la suscettibilità materna alle infezioni e modula il decorso di malattie autoimmuni (35).

Gli estrogeni intervengono anche in molteplici aspetti della biologia delle cellule B, manifestando attività diverse nelle fasi iniziali e tardive dello sviluppo. Ad esempio, alti livelli di E2, tipici della gravidanza, riducono la linfopoiesi B nel midollo osseo, ostacolando la progressione dallo stadio pro-B allo stadio pre-B. Questo effetto può essere attribuito in parte all'azione diretta degli estrogeni sulle cellule B, che esprimono ER α la cui espressione è regolata in funzione dello stadio di sviluppo. Diversamente dal ruolo inibitorio svolto da E2 nelle prime fasi dello sviluppo delle cellule B, E2 induce un'attivazione policlonale dei linfociti B favorendo la persistenza di cellule B autoreattive nella milza. Parallelamente, E2 aumenta la produzione di autoanticorpi a partire dalla popolazione di

cellule B spleniche: in un modello murino di LES, il trattamento con E2 ha favorito la sopravvivenza di cellule B autoreattive attraverso l'aumento dell'espressione del gene anti-apoptotico Bcl-2 e di geni come SHP2 e VCAM, implicati nella sopravvivenza delle B autoreattive. Questi dati contribuiscono a spiegare la maggior incidenza di malattie autoimmuni nelle donne rispetto agli uomini.

Oltre ad influenzare la differenziazione e la produzione anticorpale, l'E2 regola anche lo "switch" isotipico da IgM a IgG, (soprattutto IgG1 e IgG2b), favorendo la comparsa di anticorpi ad alta affinità per gli antigeni *self* (35, 141, 142) in maniera dose-dipendente.

LIPID RAFTS E RECETTORI DEGLI ESTROGENI

Lipid Rafts

Le membrane cellulari rappresentano l'interfaccia principale tra l'ambiente esterno e l'interno della cellula, nonché tra il citosol e i diversi compartimenti intracellulari. In particolare, la membrana plasmatica delle cellule dei mammiferi presenta regioni altamente organizzate e dinamiche, di dimensioni comprese tra 10 e 200 nm, note come *lipid rafts* o zattere lipidiche. Questi microdomini sono arricchiti in colesterolo, glicosfingolipidi (gangliosidi e sfingomieline) e fosfolipidi, e costituiscono piattaforme specializzate per l'organizzazione e la regolazione di processi di segnalazione e traffico di membrana.

I *lipid rafts* non sono presenti solo nella membrana plasmatica, ma sono stati identificati anche in altri compartimenti intracellulari, come nel reticolo endoplasmatico (ER) (143), nel complesso del Golgi (144), negli endosomi (145) e nei fagosomi (146).

Dal punto di vista morfologico e di contenuto proteico, i microdomini glicolipidici possono essere distinti in due principali sottotipi: i *lipid rafts*, strutture piatte e ordinate, e le caveolae, invaginazioni della membrana a forma di fiasco, caratterizzate da un'elevata curvatura (Figura 8).

Le caveolae contengono come componente strutturale principale le caveoline, una famiglia di proteine costituita da tre isoforme: Caveolina-1, Caveolina-2 e Caveolina-3. Le prime due sono espresse prevalentemente nelle cellule epiteliali, mentre la terza è specifica delle cellule muscolari striate e lisce (147).

I *lipid rafts*, invece, sono organizzati grazie alla presenza di flotillina, proteina strutturale costituita da due isoforme omologhe, Flotillina-1 e Flotillina-2, espresse in maniera ubiquitaria nei mammiferi (148).

Una volta inseriti nella membrana, i gangliosidi assumono un orientamento definito: la porzione idrofilica, rivolta verso l'esterno, partecipa ai processi di riconoscimento cellulare e interazione molecolare, mentre la porzione idrofobica si inserisce nel doppio strato lipidico contribuendo alla trasduzione del segnale.

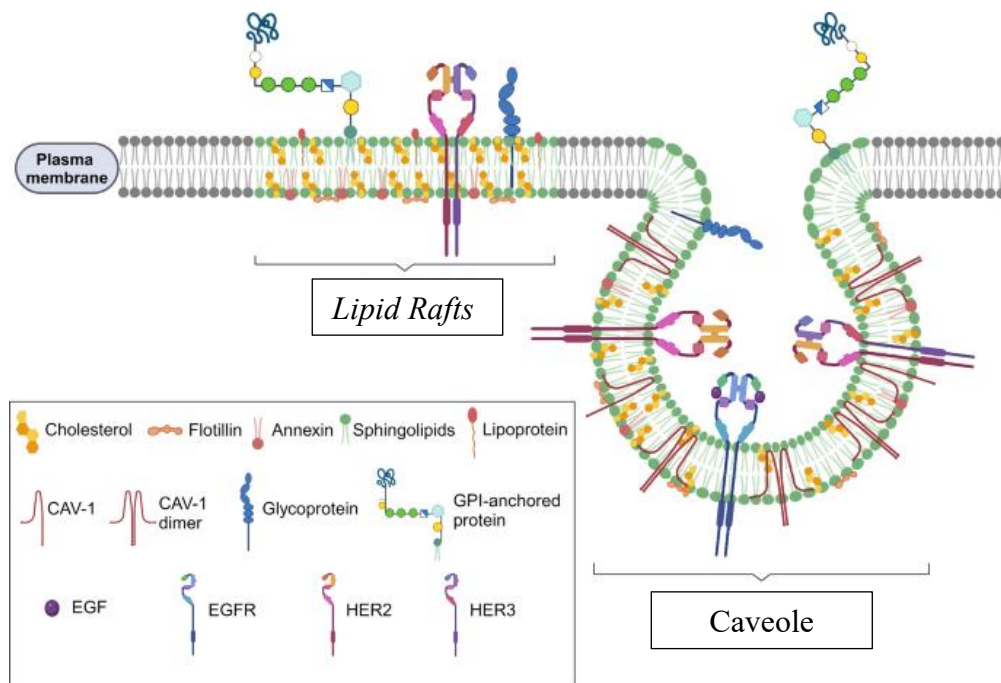
La peculiare composizione lipidica conferisce resistenza alla solubilizzazione mediante detergenti non ionici, come Triton X-100 (TX), a basse temperature, caratteristica che consente l'isolamento tramite gradiente di densità di saccarosio (149).

Il colesterolo rappresenta l'elemento dinamico principale che mantiene l'integrità dei *lipid rafts*, incrementando l'ordine dei lipidi circostanti e modulando fluidità e permeabilità della membrana. La sua presenza facilita inoltre la mobilitazione laterale e l'aggregazione di proteine e microdomini. In particolare, la segregazione fisica e l'aggregazione proteica regolano l'accessibilità dei recettori alle molecole effettrici, consentendo il loro *clustering* insieme ai ligandi e alle vie di segnalazione a valle (150).

Grazie alla loro architettura dinamica ed eterogenea, i *lipid rafts* possono assemblarsi e disassemblarsi rapidamente e modificare la loro composizione in risposta a stimoli intra- ed extra-cellulari (151). I *lipid rafts* svolgono un ruolo centrale in numerosi processi biologici, tra cui endocitosi, fagocitosi, adesione e comunicazione cellulare, e trasduzione del segnale (152). Costituiscono, infatti, vere e proprie piattaforme di trasduzione del segnale, reclutando in modo selettivo e dinamico diverse molecole di segnalazione, tra cui proteine ancorate a

glicosilfosfatidilinositolo (GPI), chinasi della famiglia Src, subunità transmembrana di proteine G, proteine palmitoilate e proteine leganti il colesterolo (153).

Sebbene molti aspetti funzionali dei microdomini di membrana restino ancora da chiarire, studi recenti suggeriscono che queste strutture rivestano un ruolo cruciale nella regolazione dei processi apoptotici, confermando la loro importanza strategica nella fisiologia e nella patologia cellulare (154-158).



Ruzzi F, et al. *Cell Communication and Signaling*, 2024

Figura 8. Organizzazione dei microdomini glicolipidici di membrana: i *lipid rafts* e le caveolae.

I *lipid rafts* sono strutture piccole e ordinate ricche di flotillina. Le caveole presentano una configurazione invaginata, chiamata caveola, ricca di caveoline. Diverse proteine e recettori, come le tirosin-chinasi, sono associati ai *lipid rafts*.

***Lipid Rafts* nelle cellule del sistema immunitario**

Le cellule del sistema immunitario esprimono un'ampia varietà di recettori in grado di percepire, trasdurre e integrare segnali provenienti dall'ambiente extracellulare, permettendo l'attivazione di risposte immunitarie appropriate. I *lipid rafts* hanno un ruolo cruciale nell'organizzazione dei recettori e nella modulazione delle cascate di segnalazione attivate dal legame con i loro ligandi (159, 160).

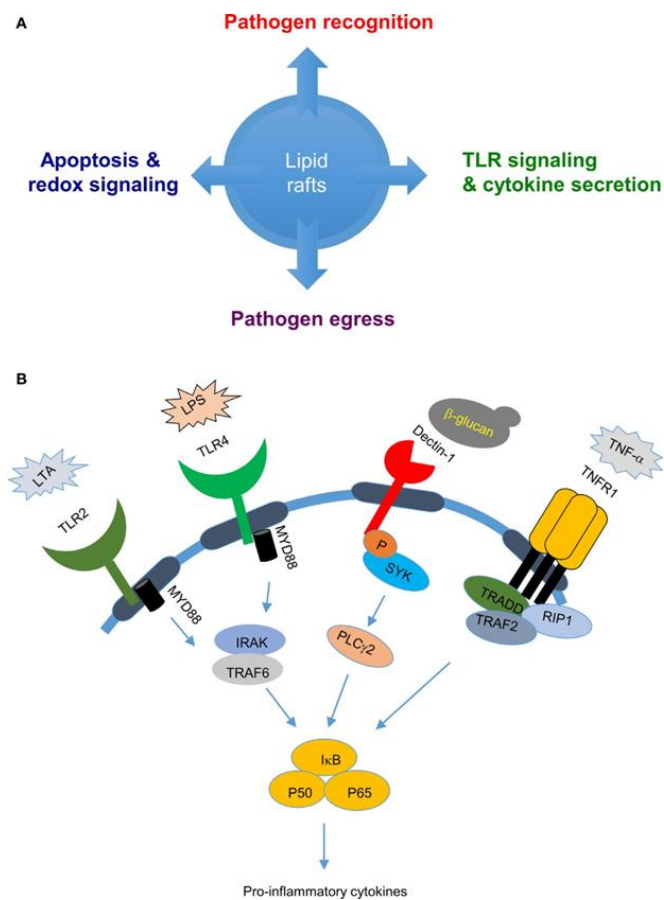
Essi agiscono come piattaforme dinamiche che concentrano recettori, molecole adattatrici e protein-chinasi, regolando intensità, durata e qualità dei segnali intracellulari generati in risposta agli stimoli ambientali.

Oltre a favorire l'assemblaggio dei complessi recettoriali, questi microdomini partecipano al riconoscimento dell'antigene, alla presentazione dei peptidi da parte delle molecole MHC, alla fagocitosi, chemiotassi e secrezione di citochine.

Nell'immunità innata, un esempio emblematico è la risposta all'LPS. L'LPS, legato alla proteina legante LPS (LBP), interagisce con la molecola CD14, una proteina ancorata al GPI localizzato nei *lipid rafts*, favorendo l'attivazione del TLR4 e il reclutamento di molecole di segnalazione a valle, come MyD88 e TRIF, indispensabili per l'avvio della risposta infiammatoria. Studi funzionali hanno dimostrato che la caveolina-1 modula l'espressione e la funzione di CD14, CD36 e MyD88 nei macrofagi (161), e contribuisce alla corretta localizzazione del TLR4 e dei suoi co-recettori nei *lipid rafts*, essenziale per un'efficace risposta immunitaria all'LPS (162).

Alcuni patogeni intracellulari, come i micobatteri, sono in grado di alterare l'architettura e le funzioni dei *lipid rafts*, compromettendo la fagocitosi, la

produzione di citochine e promuovendo la loro sopravvivenza nelle cellule dell'ospite (Figura 9) (163).



Kulkarni R, et al. *Front. Immunol*, 2022

Figure 9. Ruolo dei lipid rafts nelle interazioni patogeno-ospite.

(A) I *lipid rafts* sono coinvolti in diverse funzioni cellulari, come il riconoscimento dei patogeni e la trasmissione dei segnali intracellulari, processi che contribuiscono a determinare l'esito dell'interazione patogeno-ospite. (B) I *lipid rafts* svolgono un ruolo fondamentale nel riconoscimento dei patogeni poiché favoriscono il reclutamento dei recettori di riconoscimento del patogeno (PRR). In particolare, quando le cellule vengono stimulate con componenti della parete batterica come LPS o acido lipoteicoico (LTA). I *lipid rafts* facilitano il reclutamento dei Toll-like receptors (TLR), mentre quando le cellule rilevano componenti fungini come i β -glucani, i *lipid rafts* favoriscono il reclutamento dei recettori lectina di tipo C (CLR). L'aggregazione di questi recettori nei microdomini lipidici permette un'efficiente attivazione della cascata di segnalazione, che culmina nella secrezione di citochine e nella risposta immunitaria.

Anche la segnalazione mediata dalle IgE vede il coinvolgimento dei *lipid rafts*. Il legame delle IgE al recettore FcεRI, espresso costitutivamente su mastociti e basofili, seguito dal *cross-linking* con l'antigene legato alle IgE, promuove il reclutamento del complesso recettoriale nei *lipid rafts*.

In questi microdomini, la chinasi Lyn fosforila i domini ITAM di FcεRI, attivando una cascata di segnalazione che porta al rilascio dei mediatori pro-infiammatori e conseguente degranulazione dei mastociti (164). Proteine associate ai *lipid rafts*, come la flotillina-1, contribuiscono a modulare l'efficienza di queste risposte.

Le citochine coordinano e regolano le risposte immunitarie, attivando le cellule per combattere infezioni e stimolando la proliferazione cellulare e la riparazione dei tessuti.

È stato visto che la loro segnalazione è regolata dalla compartimentalizzazione dei propri recettori nei *lipid rafts*. L'alterazione dell'integrità di tali microdomini può compromettere la segnalazione citochinica. È stato infatti osservato che l'infezione dei macrofagi da parte di microrganismi patogeni, come *Leishmania donovani*, aumenta la fluidità della membrana ostacolando l'assemblaggio del recettore per IFN-γ nei *lipid rafts*, riducendo la risposta citochinica e favorendo la persistenza del parassita.

Nell'immunità adattativa, i *lipid rafts* sono coinvolti nella regolazione dell'attivazione sia delle cellule B che delle cellule T.

Nel linfocita B inattivato, il BCR ha scarsa affinità per i *lipid rafts* ma il legame con l'antigene ne determina un cambiamento conformazionale che induce la traslocazione del recettore in tali microdomini (165, 166). Nei *lipid rafts*, la chinasi Lyn fosforila l'eterodimero Igα/Igβ innescando la cascata di segnalazione a valle. Anche i co-recettori CD19-CD21 vengono traslocati nei

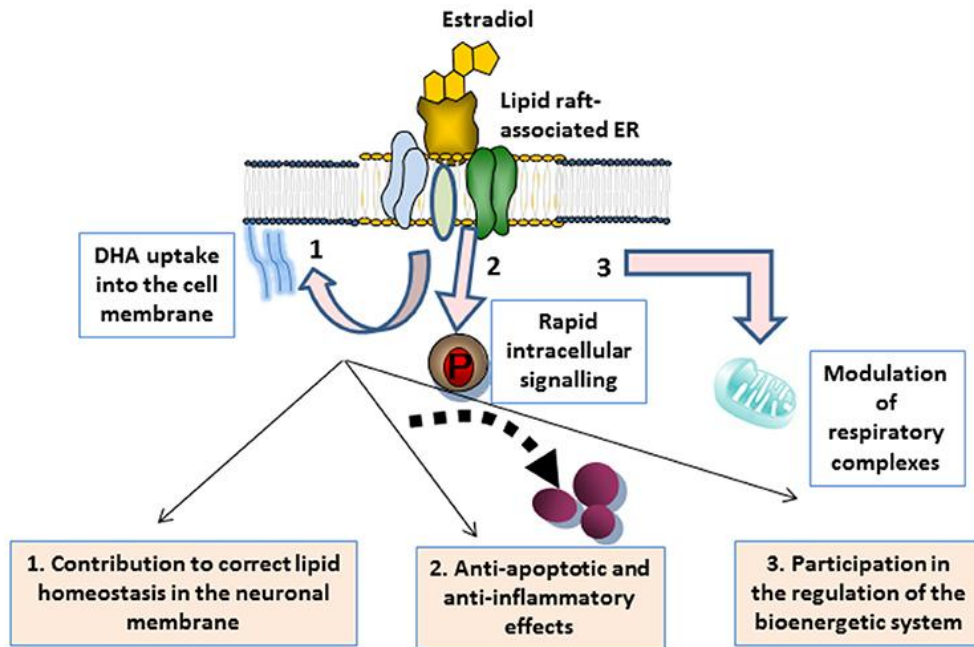
lipid rafts dopo il loro legame con il BCR, stabilizzando il complesso recettoriale e prolungando la durata del segnale (167).

Nei linfociti T, i *lipid rafts* sono coinvolti nella funzione e nella stimolazione del TCR. In condizioni basali, il TCR è situato al di fuori dei *lipid rafts* ma l'attivazione tramite il complesso MHC-peptide determina la sua traslocazione nei microdomini lipidici. Oltre al TCR, anche le molecole di segnalazione CD4 o CD8 vengono reclutate nei *lipid rafts* innescando la segnalazione a valle (168, 169). La distruzione dei *lipid rafts* da parte della metil- β -ciclodestrina influenza l'attivazione delle cellule T e la loro differenziazione verso il fenotipo Th17 (170, 171). Nel complesso, i *lipid rafts* svolgono un ruolo cruciale nella modulazione della risposta immunitaria, facilitando la concentrazione delle tirosin-chinasi, appartenenti alla famiglia Src (Lck, Fyn) (172), e favorendo il reclutamento di recettori come BCR e TCR indispensabili per l'avvio della cascata di segnalazione.

Recettori degli estrogeni e *lipid rafts*

Numerose evidenze indicano che gli estrogeni esercitano una parte delle loro funzioni attraverso azioni rapide e non genomiche, caratterizzate dall'attivazione immediata di cascate di segnalazione intracellulare come PI3K/Akt, MAPK/ERK e del fattore trascrizionale CREB. La rapidità di tali risposte suggerisce il coinvolgimento di recettori estrogenici localizzati sulla membrana plasmatica (mER) (173). I *lipid rafts* sono le piattaforme principali in cui avviene l'organizzazione dei complessi recettoriali responsabili di questi effetti extra-genomici, favorendo la concentrazione spaziale di recettori e protein-chinasi (22). Forme di mER sono state identificate in vari tipi cellulari, tra cui neuroni, cellule di carcinoma mammario (come la linea MCF-7) (174), cellule muscolari (175) e piastrine (176). Marín e Díaz (177) hanno evidenziato che, nel sistema nervoso centrale, estrogeni e *lipid rafts* costituiscono un'unità funzionale essenziale per la neuroprotezione, la stabilità mitocondriale e il controllo dello stress ossidativo. In particolare, nelle cellule nervose sono stati identificati veri e propri "*signalosome estrogenici*", strutture altamente specializzate in cui si concentrano recettori degli estrogeni, caveolina, canali mitocondriali e diverse chinasi che cooperano nel proteggere i neuroni da stress ossidativo, tossine e processi degenerativi associati all'invecchiamento. Con l'avanzare dell'età e, in modo più marcato nelle donne in menopausa, la composizione dei *lipid rafts* tende però a modificarsi: diminuiscono i livelli di colesterolo e di acidi grassi essenziali, come l'acido docosaesaenoico (*docosahexaenoic acid*, DHA), cambia la fluidità di membrana e l'efficienza di questi complessi protettivi si riduce (177-179). Tali alterazioni potrebbero contribuire a spiegare il declino della neuroprotezione mediata dagli estrogeni nelle fasi

avanzate della vita e il conseguente aumento del rischio di patologie neurodegenerative nelle donne in post-menopausa (Figura 10).



Marín R, et al. *Front. Neurosci*, 2018

Figura 10. Rappresentazione schematica delle azioni dell'estrogeno associate ai microdomini della membrana neuronale.

1. Il legame dell'estrogeno ai recettori ER localizzati nei *signalosome* lipidici attiva rapidamente le vie di trasduzione del segnale, con effetti sulla modulazione di fattori anti-apoptotici e anti-infiammatori che contribuiscono al mantenimento e alla protezione dei neuroni. 2. L'estrogeno contribuisce all'omeostasi dei lipidi di membrana, favorendo, ad esempio, l'incorporazione di DHA nei fosfolipidi. Questo supporta un corretto raggruppamento delle proteine di membrana e il mantenimento delle loro funzioni fisiologiche. 3. L'estrogeno agisce anche come modulatore energetico e metabolico, partecipando al ricambio delle membrane mitocondriali e regolando l'organizzazione dei super-complessi della catena respiratoria, elementi fondamentali per l'equilibrio bioenergetico cellulare.

Studi condotti sulle piastrine umane hanno dimostrato che l'azione degli estrogeni dipende strettamente dall'integrità di questi microdomini: la loro alterazione compromette l'attivazione di Src e Pyk2 indotta dagli estrogeni e, di conseguenza, la corretta attivazione piastrinica (176). In modo analogo, nelle cellule di carcinoma mammario MCF-7 è stato osservato che ER α e la sua variante ER α -46 co-localizzano nei *lipid rafts* insieme al recettore HER2, formando complessi funzionali capaci di attivare *pathways* proliferativi (174).

Studi su linfociti murini hanno mostrato che gli ER si concentrano nei *lipid rafts*, dove contribuiscono a modulare finemente la risposta immunitaria (180). Analisi condotte su linfociti umani hanno evidenziato che i mER localizzati nei *lipid rafts* partecipano alla regolazione dell'omeostasi cellulare, influenzando processi sia pro-apoptotici che anti-apoptotici (181), tuttavia non esistono lavori che hanno indagato la localizzazione degli ER nei *lipid rafts* in altre cellule del sistema immunitario umano.

SCOPO DEL PROGETTO

Lo scopo del mio progetto di dottorato è quello di comprendere come il 17 β estradiolo (E2), ad alta concentrazione come quella osservata nelle donne in gravidanza, modula la risposta immunitaria innata e adattativa umana. A tal fine è stato caratterizzato in dettaglio l'impatto di E2 su diversi aspetti fondamentali della funzione immunitaria, adottando un approccio integrato che combina analisi fenotipiche e funzionali.

In particolare, il progetto si è concentrato sugli effetti di E2 sul differenziamento, maturazione e funzione delle DC, con particolare attenzione alla loro capacità di presentazione dell'antigene e alla produzione di citochine.

Parallelamente, è stato studiato l'effetto di E2 sulla risposta antigene-specifica di linfociti T CD4⁺ e di iNKT attraverso l'analisi della proliferazione cellulare e del loro profilo citochinico.

Un ulteriore obiettivo prefissato è stato l'analisi dell'espressione, della distribuzione subcellulare e della modulazione dei recettori ER α ed ER β nelle diverse popolazioni immunitarie studiate, al fine di determinare come la loro localizzazione e la loro espressione potesse influenzare gli effetti mediati da E2.

Lo sviluppo di questo progetto potrebbe contribuire ad una migliore comprensione del ruolo degli estrogeni in gravidanza nella regolazione della risposta immunitaria umana, chiarendo i meccanismi molecolari che ne determinano gli effetti immunomodulatori. I risultati attesi potrebbero inoltre fornire nuove basi concettuali per l'identificazione di potenziali *target* terapeutici utili nello sviluppo di strategie innovative per modulare la risposta immunitaria sia in condizioni fisiologiche che patologiche, come malattie autoimmuni, nelle infezioni e nella risposta ai vaccini (Figura 1).

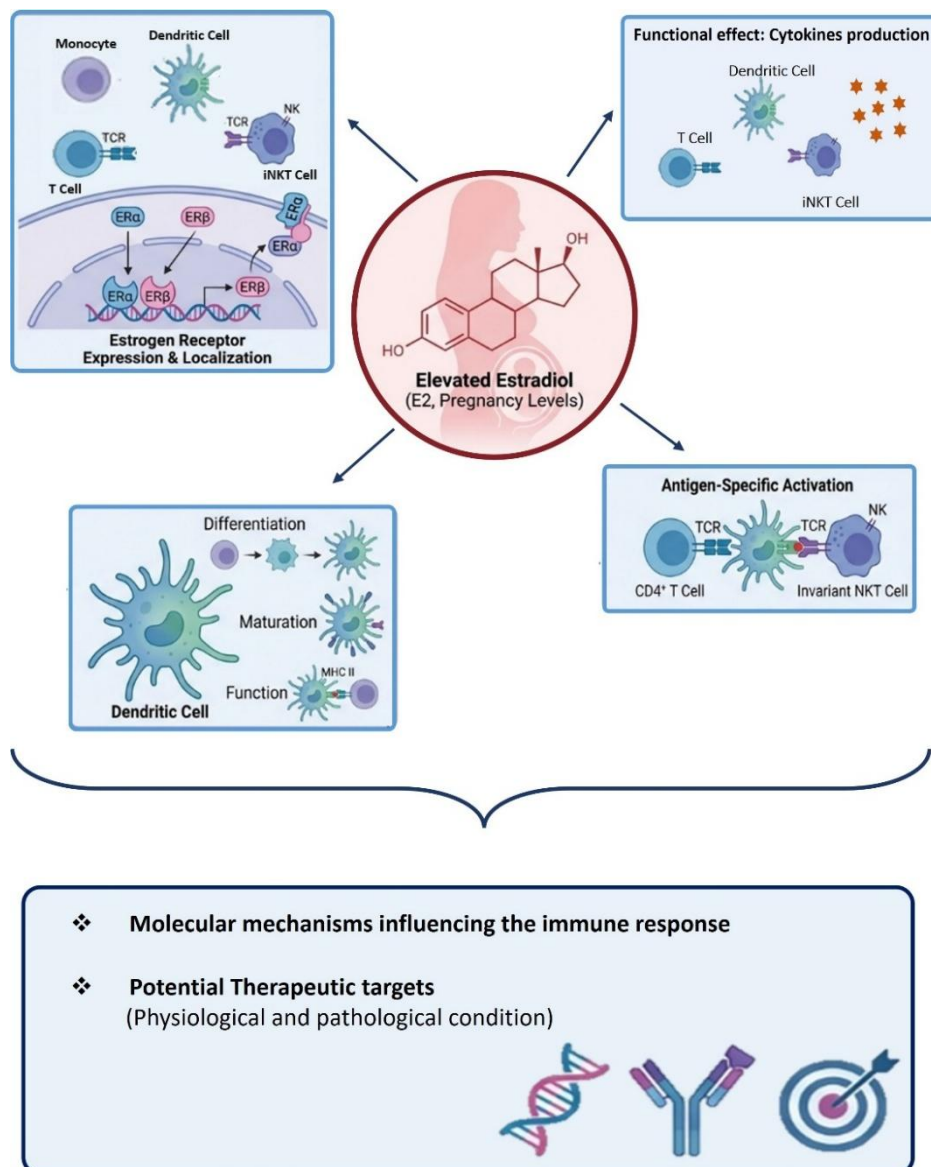


Figura 1. Graphical abstract relativo allo scopo del progetto.

In figura vengono rappresentati in maniera schematica gli scopi prefissati del progetto di ricerca. Studio dell'effetto di E2, alla concentrazione fisiologica osservata nelle donne in gravidanza, sul: differenziamento, maturazione e funzione delle DC, con particolare attenzione alla loro capacità di presentazione dell'antigene e alla produzione di citochine; risposta antigene-specifica di linfociti T CD4⁺ e di iNKT. Un ulteriore obiettivo prefissato è stato l'analisi dell'espressione, della distribuzione subcellulare e della modulazione dei recettori ER α ed ER β nelle diverse popolazioni immunitarie studiate.

MATERIALI E METODI

Isolamento delle popolazioni cellulari e loro condizioni di coltura

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate dal sangue periferico ottenuto da donatori sani, previo consenso informato (PRE-BIO CE 0000013), mediante centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Hypaque (GE Healthcare).

I linfociti T sono stati purificati dai PBMC mediante selezione immunomagnetica negativa utilizzando il Pan T Cell isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany).

I linfociti T CD4⁺ sono stati isolati tramite *sorting* magnetico indiretto con il Memory CD4⁺ T-cell Isolation kit (Miltenyi Biotec, Italia) seguendo le istruzioni del produttore.

La purezza delle cellule isolate è stata verificata tramite citofluorimetria a flusso, risultando $\geq 97\%$.

Per tutti gli esperimenti, le cellule sono state piastrate alla densità di 1×10^6 cellule/mL e coltivate in RPMI-1640 senza rosso fenolo (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS) (Hyclone Laboratories, South Logan, UT, USA), 2mM di L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di gentamicina (Sigma).

I monociti sono stati isolati dai PBMC mediante selezione positiva con microbiglie magnetiche anti-CD14 (Miltenyi Biotec), secondo le istruzioni del produttore.

Le DC sono state generate coltivando i monociti in piastre da 6 pozzetti (Corning Costar, Camelback Rd., Glendale, AZ, USA) con RPMI 1640 senza rosso fenolo integrato con 2 mM L-glutamina, 1% aminoacidi non

essenziali, 1% piruvato di sodio, 50 µg/mL kanamicina (Gibco, Billings, MT, USA) e 10% FBS (*medium* completo) in presenza di 50 ng/mL di GM-CSF (Gentaur, Bergamo, Italia) e 20 ng/mL di IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) per 5 giorni, ad una densità di 4×10^5 cellule/mL. Al quinto giorno di coltura, le DC sono state lavate per rimuovere IL-4 e GM-CSF e successivamente stimulate *overnight* con 100 ng/mL di LPS (*Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in presenza o assenza di estrogeni (Figura 2).

Per l'espansione delle iNKT, le PBMC sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti (Corning Costar, Camelback Rd., Glendale, AZ, USA) con un antigene di natura glicolipidica l' α -galactosyl-ceramide (α -GalCer, Abcam Inc, Toronto, ON, Canada) aggiunto al terreno di coltura a varie concentrazioni in presenza di IL-2 (20 unità (U)/mL) alla densità di 1×10^6 cellule/mL in *medium* completo. L'espansione delle iNKT è stata monitorata mediante analisi citofluorimetrica, utilizzando un pannello di anticorpi monoclonali (mAbs) anti-CD3 brillant violet 510 (BV510) e anti-TCR V α 24/J α 18 real yellow 586 (RY586) (BD Immunocytometry Systems) (vedi sotto). Le analisi sono state effettuate all'ottavo e al tredicesimo giorno di coltura. I dati raccolti hanno indicato un'espansione ottimale delle iNKT umane al tredicesimo giorno con l'utilizzo di α -GalCer alla concentrazione di 1 µg/mL.

Tutte le cellule sono state incubate a 37 °C con un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

I trattamenti sono stati condotti utilizzando una cappa a flusso laminare verticale per garantire la sterilità dell'ambiente di lavoro.



Figura 2. Protocollo differenziamento delle DC derivate da monociti.

Rappresentazione schematica del protocollo di differenziamento delle DC a partire da monociti umani isolati da PBMC di sangue periferico di donatori sani mediante *sorting* magnetico.

Trattamenti con estrogeno

L'estrogeno (17 β -estradiol, E2, Sigma), subito prima degli esperimenti, è stato disciolto in etanolo (EtOH), in modo da ottenere una concentrazione finale di 10 mM. Successivamente è stato ulteriormente diluito in RPMI 1640 senza rosso fenolo per ottenere la concentrazione di utilizzo di 100 nM, corrispondente ai livelli fisiologici riscontrati nelle donne in gravidanza. I tempi di trattamento delle DC con E2 sono variati in base al parametro sperimentale studiato: per lo studio della localizzazione nei *lipid rafts*, le cellule sono state trattate per 10 minuti, mentre per valutare l'effetto sulla maturazione delle DC l'estrogeno è stato aggiunto al quinto giorno di coltura e lasciato per 24 ore. Come controllo negativo, le cellule sono state trattate con un volume di EtOH equivalente a quello contenuto nei campioni trattati con E2.

I PBMC stimolati per 13 giorni con α -GalCer sono stati trattati con 100 nM di E2 al tempo zero.

Il trattamento con E2 è stato condotto anche su linfociti T, pre-incubati per 24 ore con mAb anti-CD3 (mAb, clone UCHT1, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), alla concentrazione di 4 μ g/ml mediante *coating* su piastra da 96 a fondo ad U. Dopo 8 ore di trattamento con E2 i linfociti T sono stati stimolati: i) con 25 ng/mL di forbolo miristato acetato (PMA, Sigma) e 1 μ g/ml di ionomicina (Sigma) per 16 ore, per analizzare l'espressione intracellulare di IFN- γ , TNF- α e IL-4; ii) con 50 ng/ml di PMA (Sigma) e 1 μ g/ml di ionomicina (Sigma) per 4 ore, per analizzare l'espressione intracellulare di IL-17; iii) con 2.5 μ g/ml di fitoemoagglutinina (PHA, Sigma) per 16 ore, per l'espressione intracellulare di IL-10. In tutti questi trattamenti, nelle ultime 4 ore è stata aggiunta la Brefeldina A (Sigma) alla

concentrazione di 10 µg/ml, per bloccare la secrezione di citochine a livello dell'apparato di Golgi.

Reazione leucocitaria mista (MLR)

Le DC immature e le DC stimulate *overnight* con LPS (Sigma) ± E2 (100 nM) sono state lavate con PBS e co-coltivate con linfociti T CD4⁺ allogenici purificati in rapporto 1:10 (DC:T).

Per valutare la proliferazione, prima di co-coltivarli con le DC, i linfociti T CD4⁺ sono stati marcati con la Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE, Thermo Fisher Scientific), la cui fluorescenza si dimezza ad ogni divisione cellulare. In dettaglio, le cellule sono state lavate in PBS e risospese a 1×10⁶ cellule/mL, incubate con CFSE a 5 µM per 10 minuti a 37 °C al buio, mescolando delicatamente ogni 2–3 minuti. La reazione è stata bloccata aggiungendo 5 mL di *medium* completo freddo, seguito da due lavaggi in RPMI + 10% FBS. Le cellule sono state quindi poste in coltura nelle condizioni sperimentali.

Al settimo giorno di co-cultura tra le DC e le cellule T CD4⁺, la proliferazione è stata analizzata tramite analisi citofluorimetrica, identificando le cellule CFSE low⁺.

I supernatanti delle co-culture sono stati raccolti per l'analisi della produzione di citochine utilizzando il Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), secondo le indicazioni del produttore (vedi di seguito).

Analisi delle citochine mediante Cytometric Bead Array (CBA)

Al quinto giorno di coltura, le DC sono state lavate per rimuovere IL-4 e GM-CSF e successivamente stimulate *overnight* con 100 ng/mL di LPS in presenza o assenza di E2 a 100 nM.

I supernatanti sono stati raccolti, centrifugati per rimuovere eventuali detriti cellulari e conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino all'analisi.

La quantificazione delle citochine (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70) è stata effettuata mediante lo Human Inflammatory Cytokine CBA Kit (BD Biosciences), seguendo le istruzioni del produttore. In breve, 50 μL di *Capture Beads* specifiche per ciascuna citochina sono state incubate con 50 μL di campione o standard e 50 μL di PE *Detection Reagent* per 2 ore a temperatura ambiente (RT) al buio. I campioni sono stati lavati con 1 mL di *Wash Buffer*, centrifugati ($200 \times g$ per 5 minuti) e risospesi in 300 μL di buffer prima dell'acquisizione al citofluorimetro BD FACS Symphony A1. L'analisi quantitativa delle concentrazioni di ciascuna citochina è stata effettuata utilizzando il *software* FCAP Array v3.0 (BD Biosciences).

In modo analogo, i supernatanti derivanti dalle colture miste DC–linfociti T trattate o meno con E2 (100 nM) sono stati analizzati mediante lo Human Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit (BD Biosciences), per la determinazione simultanea di IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A, seguendo le stesse condizioni di incubazione e acquisizione.

Analisi mediante citofluorimetria

Caratterizzazione fenotipica. I linfociti T, le DC e le PBMC trattate con α -GalCer sono state raccolte, lavate con PBS ed incubate con specifiche combinazioni di mAbs murini direttamente coniugati:

Per i linfociti T: i) anti-CD3 allofococianina (APC), ii) anti-CD4 ficoeritrina (PE), iii) anti-CD8 peridinclorofillina (PerCP) (tutti distribuiti da BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA);

Per le DC: i) anti-CD1a fluoresceina isotiocianato (FITC), ii) anti-CD14 PE, iii) anti-CD80 FITC, iv) anti-CD86 PE, v) anti-CD83 FITC (tutti distribuiti da BD), vi) anti-MHC I classe FITC, vii) anti-MHC II classe FITC (Miltenyi Biotec)

Per le PBMC trattate con α -GalCer: i) anti-CD3 BV510 ii) anti-CD4 APC, iii) anti-CD8 brillant violet 780 (BV780), iv) anti-TCR-V α 24/J α 18 RY586 (tutti distribuiti da BD).

Per tutti gli anticorpi utilizzati, in parallelo sono stati utilizzati appropriati controlli isotipici.

Espressione intracellulare di IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e IL-17. Le PBMC stimulate con PMA e ionomicina e/o PHA e trattate e non con E2 a 100nM, sono state lavate con PBS 0.1% FBS, fissate con Fixation Buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA) per 20 minuti al buio a RT, e permeabilizzate con Permeabilization Buffer 1x (eBioscience) per 5 minuti. Dopo lavaggio con Permeabilization Buffer 1x, le cellule sono state incubate per 20 minuti al buio a RT, con i seguenti mAbs in opportune combinazioni: i) anti-IFN- γ FITC, anti-TNF- α PE, anti-IL-4 PE, anti-IL-10 PE (tutti distribuiti da BD) e anti-IL-17A FITC (eBioscience).

In parallelo sono stati utilizzati appropriati controlli isotipici.

Proliferazione cellulare. La proliferazione dei linfociti T CD4⁺ delle reazioni leucocitarie miste è stata valutata mediante colorazione con CFSE come descritto precedentemente. Una piccola quota di cellule appena marcate con CFSE è stata acquisita al citofluorimetro per definire il livello di fluorescenza della CFSE al tempo 0. La diluizione del CFSE è stata analizzata al citofluorimetro dopo 7 giorni di co-coltura per quantificare la proliferazione in base alla percentuale di cellule CFSE_{low}⁺.

Espressione intracellulare di ER α e ER β . Per valutare l'espressione intracellulare dei recettori per gli estrogeni i linfociti T, monociti, DC e i PBMC stimolati con α -GalCer sono stati fissati e permeabilizzati con il kit Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA, USA) e incubati con mAbs anti-ER α Alexa Fluor 647 (AF647) e/o FITC, e anti-ER β FITC (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Sono stati inclusi appropriati controlli isotipici per ogni campione.

Per tutte le analisi, le diverse popolazioni cellulari sono state inizialmente identificate sulla base dei parametri fisici "dimensione" (*forward scatter*, FSC) e complessità (*side scatter*, SSC) e successivamente caratterizzate sulla base dell'espressione delle molecole di superficie specifiche.

Le acquisizioni sono state effettuate mediante citofluorimetro Beckman Coulter CytoFLEX LX e i dati analizzati con il *software* Cytexpert versione 2.6 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Per ogni campione sono stati acquisiti 50.000–250.000 eventi, a seconda del parametro analizzato.

Immunofluorescenza e microscopia confocale a scansione laser (CSLM)

Per la colorazione di immunofluorescenza le diverse cellule (monociti, le cellule DC, e linfociti T) sono state seminate su vetrini coprioggetti rivestiti con poli-L-lisina (Sigma), fissate in paraformaldeide al 3% (20 minuti, 4 °C), quindi trattate con 50 mM NH₄Cl in PBS per 10 minuti a 4 °C per neutralizzare i gruppi aldeidici residui. La permeabilizzazione è stata eseguita in PBS contenente lo 0.1% TX per 10 minuti a 4 °C.

Successivamente, le cellule sono state trattate con soluzione contenente 3% BSA in PBS per 30 minuti a 4 °C, al fine di ridurre i legami aspecifici degli anticorpi.

Le cellule sono state, quindi, marcate con anticorpi anti-ER α o anti-ER β (Santa Cruz), seguiti da anticorpo secondario Goat anti-mouse IgG AF594 (Invitrogen).

Per la marcatura del citoscheletro di actina è stata utilizzata la falloidina coniugata con AF488 (Molecular Probes).

L'analisi dei *lipid rafts* è stata effettuata mediante l'analisi della distribuzione del ganglioside GM1 utilizzando il kit Vybrant™ Alexa Fluor™ 488 Lipid Rafts Labeling Kit Invitrogen. In dettaglio, le cellule vive sono state marcate con CTB coniugata ad AF488 (1 μ g/mL, 10 minuti, 4 °C) seguito dall'anticorpo anti-CTB (15 minuti, 4 °C), successivamente, le cellule sono state fissate e trattate come descritto sopra.

I nuclei sono stati colorati con DAPI (Thermo Fisher Scientific). Infine, i vetrini sono stati montati con *medium* antifading Vectashield (Vector Laboratories, Newark, CA, USA).

Le osservazioni CSLM sono state effettuate con microscopio confocale a scansione laser LSM 980 (Carl Zeiss) utilizzando un obiettivo a olio 63×/1.40 NA e laser di eccitazione a 405, 488 e 543 nm.

I segnali provenienti da diverse sonde fluorescenti sono stati acquisiti con impostazioni di scansione sequenziale e le co-localizzazioni sono state visualizzate in immagini combinate. L'acquisizione e l'elaborazione delle immagini sono state effettuate utilizzando il *software* confocale ZEN 3.3 (edizione Blue) e il *software* Photoshop CS5 (Adobe System Inc., San Jose, CA, USA)

Isolamento dei *lipid rafts* su gradiente di saccarosio

I *lipid rafts* sono stati isolati da DC trattate e non con E2 a 100 nM per 10 minuti mediante estrazione con TX a basse temperature seguita da ultracentrifugazione su gradiente discontinuo di saccarosio (149). In dettaglio, le DC sono state lavate con PBS freddo e risospese in tampone MES (25 mM MES, pH 6.5, 150 mM NaCl) contenente 1% TX, inibitori delle proteasi (0.1 µg/mL PMSF, 2 µg/mL aprotinina, 2 µg/mL leupeptina, 1 µg/mL pepstatina A) e 1 mM ortovanadato di sodio. La sospensione cellulare è stata omogeneizzata mediante un omogeneizzatore Dounce a pestello stretto (Wheaton, Millville, NJ, USA) e miscelata in rapporto 1:1 con una soluzione di saccarosio all'80% (p/v) in tampone MES per ottenere una soluzione al 40% di saccarosio. Quest'ultima è stata posta sul fondo dei tubi da ultracentrifuga (compatibili con il rotore SW60Ti, Beckman Coulter) su cui sono stati stratificati il 30% e 5% di saccarosio.

I campioni così stratificati sono stati ultracentrifugati a 45.000 rpm per 16 ore a 4 °C utilizzando il rotore oscillante SW60Ti. Al termine, sono state

raccolte 12 frazioni di pari volume (0.375 mL ciascuna) a partire dalla parte superiore dei tubi.

Successivamente, 40 μ L delle singole frazioni sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di sodio dodecil solfato-poliacrilammide (SDS-PAGE) e immunoblotting. Le frazioni 4-6 sono distinguibili come un anello opaco galleggiante che migra al 20% di saccarosio e corrispondono ai *lipid rafts*. Le frazioni 1-2, che non contengono proteine, e la frazione 12, corrispondente alla porzione nucleare, non sono state sottoposte a SDS-PAGE. In alcuni esperimenti, le frazioni 3-6 (frazione insolubile in TX) e le frazioni 8-11 (frazione solubile in TX) sono state raggruppate in due *pool* distinti, e una quantità uguale di proteine di ciascun gruppo, analizzata mediante saggio BCA (kit Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific), è stata separata mediante SDS-PAGE e sottoposta ad analisi immunoblotting.

Immunoblotting

I campioni sono stati lisati con il tampone di lisi (10mM TRIS pH 8.0, 150mM NaCl, 0.06M octyl glucoside, 5mM EDTA, 1% TX, 1mM Na₃VO₄ e inibitori delle proteasi), il contenuto proteico è stato valutato con il saggio BCA (kit Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific). I campioni sono stati caricati su gel 4-12% di poliacrilammide NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen) in modo volumetrico o con la stessa quantità di proteine e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata bloccata con latte in polvere al 5% in tampone TBST (10 mm Tris-HCl (pH 8.0), 150 mm NaCl, 0.1% Tween 20) per 45 minuti RT, seguita da incubazione per 1 ora a RT con anticorpi primari: anti-Flotillina-1 (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-TFR-1 (Santa Cruz). Successivamente, il filtro è stato incubato con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con perossidasi

(Bio-Rad Hercules, CA, USA) per 1 ora a RT e la reattività è stata rilevata mediante il kit di chemiluminescenza (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA). L'arricchimento delle proteine è stato determinato mediante quantificazione densitometrica utilizzando il *software* ImageJ.

Analisi statistica

I dati sono espressi come media aritmetica \pm deviazione standard (DS). La significatività statistica tra i diversi campioni è stata calcolata utilizzando il test *U* di *Mann-Whitney* tramite il programma GraphPad Prism, versione del software 8.0.1 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA). Un valore di *P* inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

ER α e ER β sono espressi nei linfociti T: l'attivazione con l'anticorpo anti-CD3 induce l'up-regolazione di ER α mentre il trattamento con E2 induce la localizzazione nei *lipid rafts*.

Diversi lavori hanno dimostrato che le cellule del sistema immunitario esprimono livelli rilevabili di ER α e ER β a livello intracellulare (26, 34, 182). Sulla base di tali evidenze, è stata valutata, per prima cosa, se la stimolazione *ex-vivo* dei linfociti T con anti-CD3, classico stimolo di attivazione di queste cellule, potesse modificare l'espressione intracellulare dei recettori ER α e ER β . Inoltre, è stato analizzato se il trattamento con E2, ad alta concentrazione osservabili nelle donne in gravidanza, potesse influenzare la localizzazione cellulare dei due recettori. A tal fine, i livelli di espressione e la localizzazione di ER α e ER β sono stati analizzati sui linfociti T isolati da sangue di donatori sani sia in condizioni basali che dopo attivazione con anticorpo anti-CD3 (Figura 1A-C). L'analisi citofluorimetrica evidenzia che le cellule T *resting* esprimono entrambi i recettori ER α e ER β . La stimolazione dei linfociti con anti-CD3 ha determinato un incremento significativo dell'espressione di ER α e non di ER β rispetto alle cellule di controllo (cellule trattate *versus* cellule non trattate, $P = 0.02$, Figura 1B). Questo risultato suggerisce che l'attivazione dei linfociti T regola l'espressione di ER α .

Al fine di valutare se la stimolazione estrogenica a concentrazioni fisiologiche tipiche della gravidanza potesse indurre modificazioni nella localizzazione dei recettori, i linfociti T sono stati analizzati mediante la tecnica di immunofluorescenza. Le immagini di confocale mostrano che, nei linfociti *resting* non trattati, sia ER α che ER β presentano una localizzazione

prevalentemente nucleare ed il trattamento con E2, invece, determina la co-localizzazione di ER α con la subunità della tossina colerica (CTB), considerata un marker dei *lipid rafts* per la sua capacità di legarsi al GM1. Lo stimolo ormonale è, quindi, in grado di indurre uno spostamento ER α , senza tuttavia modificare la fluorescenza di ER β che si presenta prevalentemente a livello nucleare sia in cellule di controllo che trattate con E2 (Figura 1C).

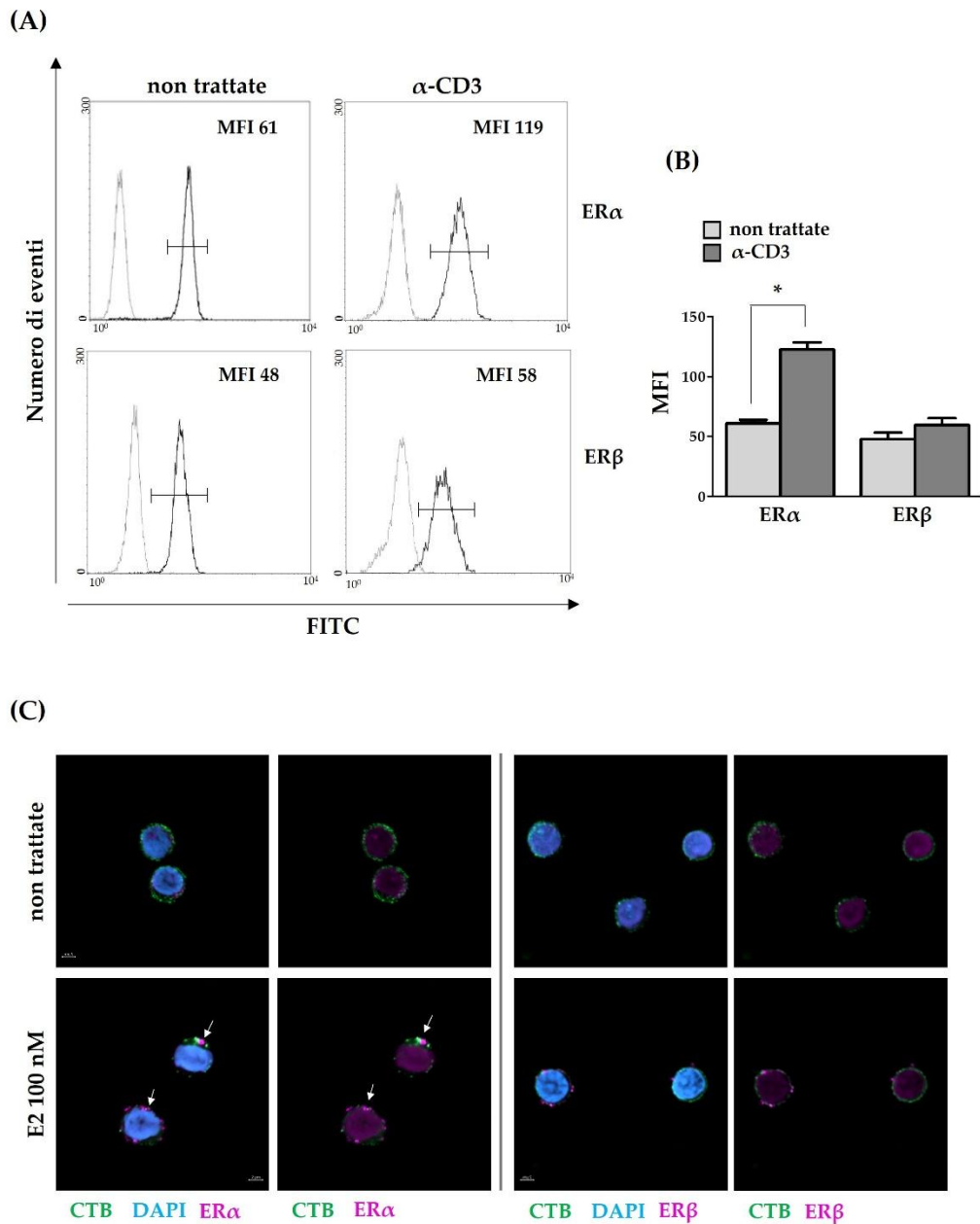


Figura 1. L'attivazione dei linfociti T induce up-regolazione dell'espressione di ER α e il trattamento con E2 a 100nM modifica la localizzazione di ER α .

(A, B) I livelli di espressione di ER α e ER β sono stati valutati tramite analisi citofluorimetrica misurando l'espressione dei recettori nei linfociti T attivati con anticorpo monoclonale anti-CD3 (α -CD3) per 48 ore. (A) I numeri riportati indicano i valori dell'intensità media di fluorescenza (*mean fluorescence intensity*, MFI) relativa all'espressione dei recettori rilevati con anticorpi specifici marcati con FITC. Il controllo isotipico è indicato in grigio chiaro, mentre l'anticorpo specifico è mostrato in nero. I risultati mostrati sono rappresentativi di un donatore sano analizzato. (B) Il grafico illustra i valori di MFI dell'espressione di ER α e ER β nei linfociti trattati e non trattati con α -CD3, riportati come media aritmetica \pm DS

di 10 donatori sani. *, $P < 0.05$ cellule trattate *versus* cellule non trattate. (C) CSLM analisi di linfociti *resting* non trattati (pannelli superiori) o trattati con E2 (100 nM) per 10 min a 37 °C (pannelli inferiori). Le cellule sono state incubate con la CTB, marcatore dei *lipid rafts* (in verde), ER α (a sinistra) ed ER β (a destra) in magenta. Il nucleo è marcato con il DAPI (in azzurro). Le aree di co-localizzazione (rilevate in bianco) sono indicate dalle frecce.

E2 inibisce la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di linfociti T

In linea con gli obiettivi prefissati, è stato studiato l'effetto del trattamento con E2 sulla produzione di citochine pro-infiammatorie (IFN- γ , TNF- α , IL-17) e anti-infiammatorie (IL-4, IL-10) da parte di linfociti T umani stimolati *ex-vivo*. In particolare, è stato osservato che l'E2 a 100nM riduce significativamente la percentuale di linfociti T CD4⁺ che producono IL-17 e TNF- α (per IL-17, cellule trattate *versus* cellule non trattate, $P = 0.04$; per TNF- α , $P = 0.01$, Figura 2) e la percentuale di linfociti T CD8⁺ che producono IFN- γ (cellule trattate *versus* cellule non trattate, $P = 0.02$, Figura 2).

Contrariamente non è stato osservato nessun cambiamento significativo nella percentuale di linfociti T CD4⁺/IFN- γ ⁺, IL-10⁺ e CD8⁺/TNF- α ⁺, IL-4⁺, e IL-17⁺ in seguito al trattamento con E2 (Tabella 1).

Tutti gli esperimenti condotti hanno incluso campioni di controllo con cellule trattate con solo EtOH ed i risultati ottenuti non hanno mostrato differenze significative rispetto alle cellule non trattate (dati non mostrati).

(A)

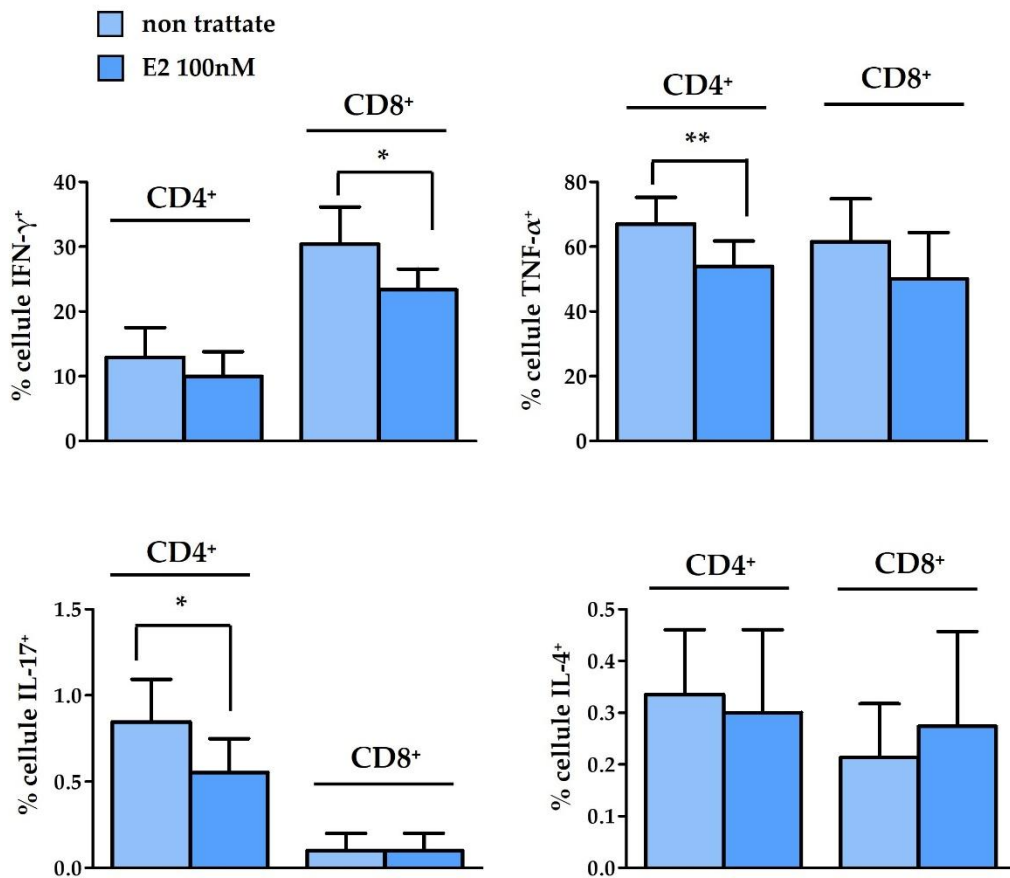


Figura 2. Il trattamento con E2 ad alta concentrazione inibisce la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di linfociti T.

(A) La produzione di citochine intracellulari da parte di linfociti T isolati da sangue periferico di donatori sani è stata analizzata mediante analisi citofluorimetrica dopo opportune stimolazioni specifiche per ciascuna citochina analizzata (vedi materiali e metodi). I grafici mostrano la % di cellule T CD4⁺ o CD8⁺ secernenti le citochine indicate all'interno della popolazione CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD8⁺, rispettivamente, considerata come il 100%. I dati sono riportati come media aritmetica della percentuale di cellule \pm DS relativa ai 10 donatori sani studiati. *, $P < 0.05$ cellule trattate con E2 100 nM *versus* cellule non trattate, **, $P < 0.01$ cellule trattate con E2 100nM *versus* cellule non trattate

Sottopopolazione	non trattate (% cellule)	17 β -estradiolo (% cellule)	<i>P</i>
CD4 ⁺ /IL-17 ⁺	0.8 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	0.0405
CD8 ⁺ /IL-17 ⁺	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.8195
CD4 ⁺ /TNF- α ⁺	67 \pm 8	52 \pm 8	0.0100
CD8 ⁺ /TNF- α ⁺	61 \pm 13	50 \pm 14	0.1649
CD4 ⁺ /IFN- γ ⁺	13 \pm 5	10 \pm 4	0.2008
CD8 ⁺ /IFN- γ ⁺	31 \pm 6	23 \pm 3	0.0262
CD4 ⁺ /IL-4 ⁺	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	0.6991
CD8 ⁺ /IL-4 ⁺	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	0.9360
CD4 ⁺ /IL-10 ⁺	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	0.7458

TABELLA 1. Effetto del trattamento con E2 su linfociti T sull'espressione intracellulare di citochine infiammatorie mediante citometria a flusso

Per i linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, i dati sono espressi come percentuale di cellule T CD4⁺ o CD8⁺ secernenti le citochine indicate all'interno della popolazione CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD8⁺, rispettivamente, considerata come il 100%. I dati sono riportati come media aritmetica della percentuale di cellule \pm DS relativa ai 10 donatori sani studiati. Il valore di *P* è stato calcolato utilizzando il test *U* di *Mann-Whitney*.

ER α e ER β sono espressi nei monociti e nelle cellule dendritiche umane: il processo di differenziamento Mo-DC ne modula l'espressione

Successivamente, lo studio si è concentrato sull'analisi dell'espressione dei recettori estrogenici e sull'effetto di E2 sulle cellule del sistema immunitario innato, in particolare sui monociti e sulle DC differenziate da monociti umani. L'espressione dei recettori ER α ed ER β è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica. I risultati mostrano che entrambi i tipi cellulari esprimono tali recettori a livello intracellulare e che il processo di differenziamento da monociti a DC modula la loro espressione: in particolare, si osserva un incremento significativo dei livelli di ER α (monociti *versus* cellule dendritiche, $P = 0.001$, Figura 3) e una riduzione statisticamente significativa dei livelli di ER β (monociti *versus* cellule dendritiche, $P = 0.04$, Figura 3). Inoltre, si osserva una minore espressione di ER β rispetto a ER α nelle DC in linea con quanto riportato in precedenti studi su cellule dendritiche murine (183-185).

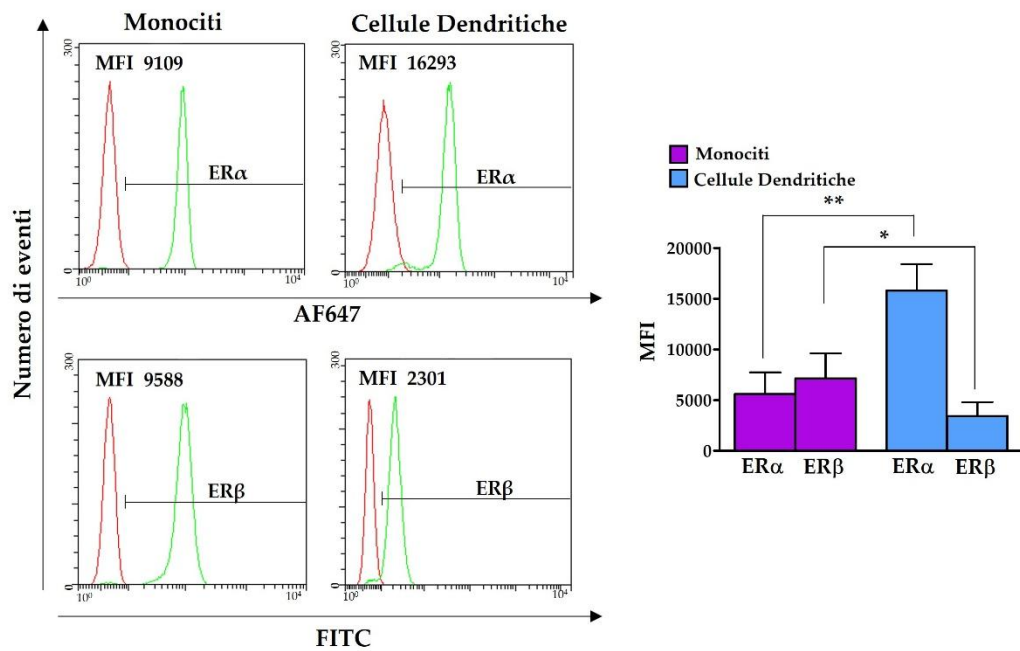


Figura 3. Il differenziamento da monociti a DC induce up-regolazione dell'espressione di ER α e down-regolazione di ER β .

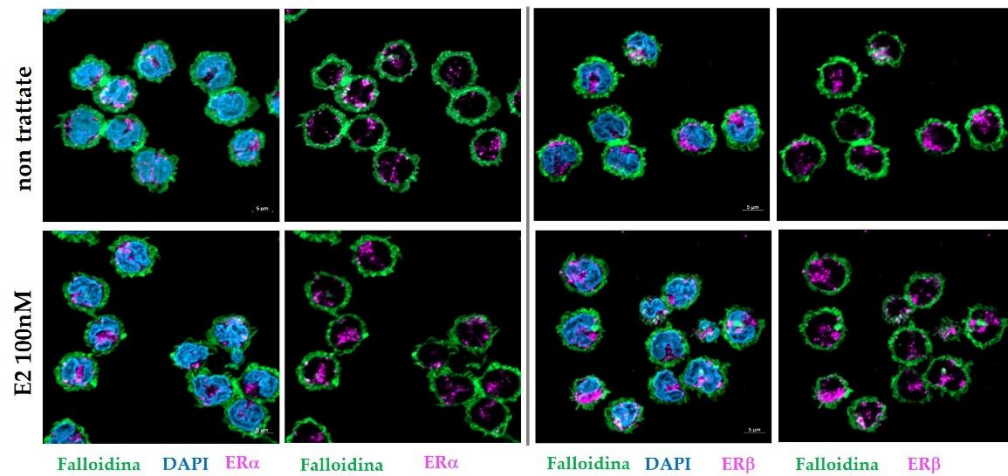
(A, B) I livelli di espressione intracellulare di ER α e ER β nei monociti e nelle cellule dendritiche da loro derivate sono stati valutati tramite analisi citofluorimetrica. (A) I risultati mostrati sono rappresentativi di un donatore sano analizzato. I numeri riportati rappresentano i valori dell'intensità media di fluorescenza (*mean fluorescence intensity*, MFI) relativa all'espressione dei recettori rilevati con anticorpi specifici. Il controllo isotipico è indicato in rosso, mentre l'anticorpo specifico è mostrato in verde. (B) Il grafico illustra i valori di MFI dell'espressione di ER α e ER β nei monociti (in viola) e nelle DC (in azzurro), riportati come media aritmetica \pm DS di 10 donatori sani analizzati. *, $P < 0.05$ monociti *versus* DC; **, $P < 0.01$ monociti *versus* DC.

Il trattamento con E2 induce la localizzazione di ER α nei *lipid rafts* delle DC

Al fine di analizzare la localizzazione subcellulare dei recettori ER α ed ER β e valutare l'effetto del trattamento con E2 ad alta concentrazione sulla distribuzione dei recettori, sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza su monociti e DC. I monociti, non esprimendo un'alta positività della CTB, sono stati marcati con la falloidina che consente di evidenziare la struttura citoscheletrica cellulare. I risultati mostrano che, nei monociti, entrambi i recettori presentano una localizzazione prevalentemente intracellulare, che non risulta modificata dal trattamento con E2 (Figura 4A). Nelle DC, ER α ed ER β risultano localizzati principalmente a livello intracellulare nelle cellule non trattate; tuttavia, in seguito al trattamento con E2 alla concentrazione di 100nM corrispondente a quella riscontrata nelle donne in gravidanza, ER α mostra una localizzazione nei *lipid rafts*, come evidenziato dalla sua co-localizzazione con la CTB, marker dei microdomini glicolipidici (Figura 4B). Per confermare il dato di immunofluorescenza, dalle DC trattate e non trattate con E2 sono stati isolati i *lipid rafts*, che grazie alla loro resistenza alla solubilizzazione con TX possono essere separati mediante ultracentrifugazione con gradiente di densità di saccarosio (vedi materiali e metodi). Le diverse frazioni ottenute sono state caricate volumetricamente e analizzate mediante Western blotting (WB), così da valutare un effettivo spostamento della proteina di interesse. Come controllo di un corretto frazionamento è stata analizzata sia l'espressione del recettore per la transferrina TFR-1 (CD71), considerato un marker negativo dei *lipid rafts*, che della Flotillina-1, un marker positivo dei microdomini glicolipidici. La figura 5A mostra come nei gradienti analizzati il TFR-1 sia espresso

correttamente in regioni Triton solubili (8-11) mentre la Flotillina-1 nelle regioni Triton insolubili (3-6), frazioni corrispondenti ai *lipid rafts*. L'analisi dell'espressione del recettore ER α mostra prevalentemente una localizzazione in regioni Triton solubili con una bassa espressione in regioni Triton insolubili. In questa prima indagine sembra che il trattamento di DC umane con E2 non comporti cambiamento della localizzazione di ER α . Successivamente, quindi, è stata valutata l'espressione di questo recettore caricando per quantità di proteine. A tal fine è stato creato un *pool* delle frazioni 3-6 ed uno delle frazioni 8-11, quindi i diversi *pool* sono stati quantificati e sottoposti a WB. L'analisi densitometrica ha rilevato un incremento dei livelli di espressione di ER α nelle frazioni 3-6 (Triton-insolubili) in seguito al trattamento con E2, rispetto alle DC non trattate (Figura 5B), confermando la tendenza del recettore ad aumentare nei *lipid rafts* dopo il trattamento, come evidenziato dall'immunofluorescenza.

(A)



(B)

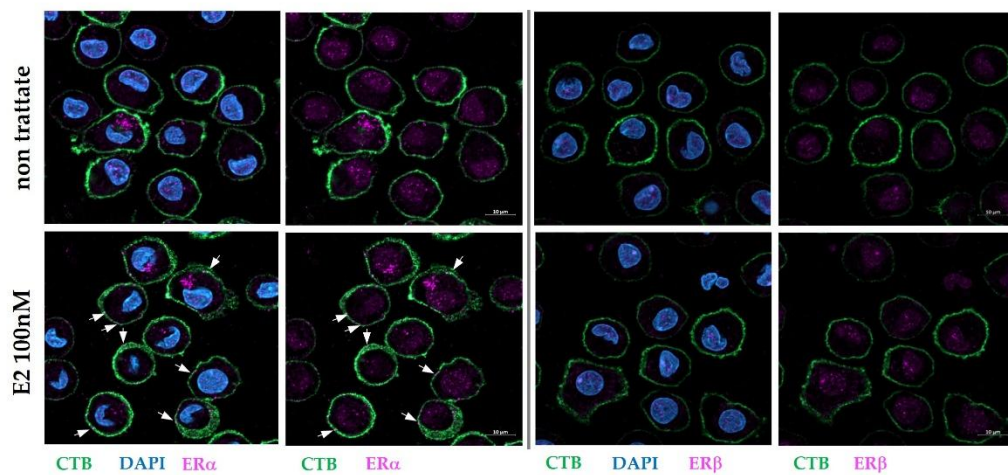


Figura 4. Espressione subcellulare di ER α e ER β in monociti e cellule dendritiche umane: il trattamento delle DC con E2 a 100nM modifica la localizzazione di ER α .

(A) Analisi al CSLM di monociti umani non trattati (pannelli superiori) o trattati con E2 (100 nM) per 10 min a 37 °C (pannelli inferiori). Le cellule sono state fissate e colorate con la falloidina, marcatore del citoscheletro (in verde), con gli anticorpi anti-ER α e ER β (in magenta) e con il DAPI (in azzurro) per marcare il nucleo. (B) Le DC non trattate (pannelli superiori) o trattate con E2 (100 nM) per 10 min a 37 °C (pannelli inferiori) sono state colorate con la CTB (verde), marker dei *lipid rafts*, poi fissate e incubate con gli anticorpi anti-ER α e ER β (magenta). Il nucleo è marcato con il DAPI (in azzurro). Le aree di co-localizzazione (rilevate in bianco) sono indicate dalle frecce.

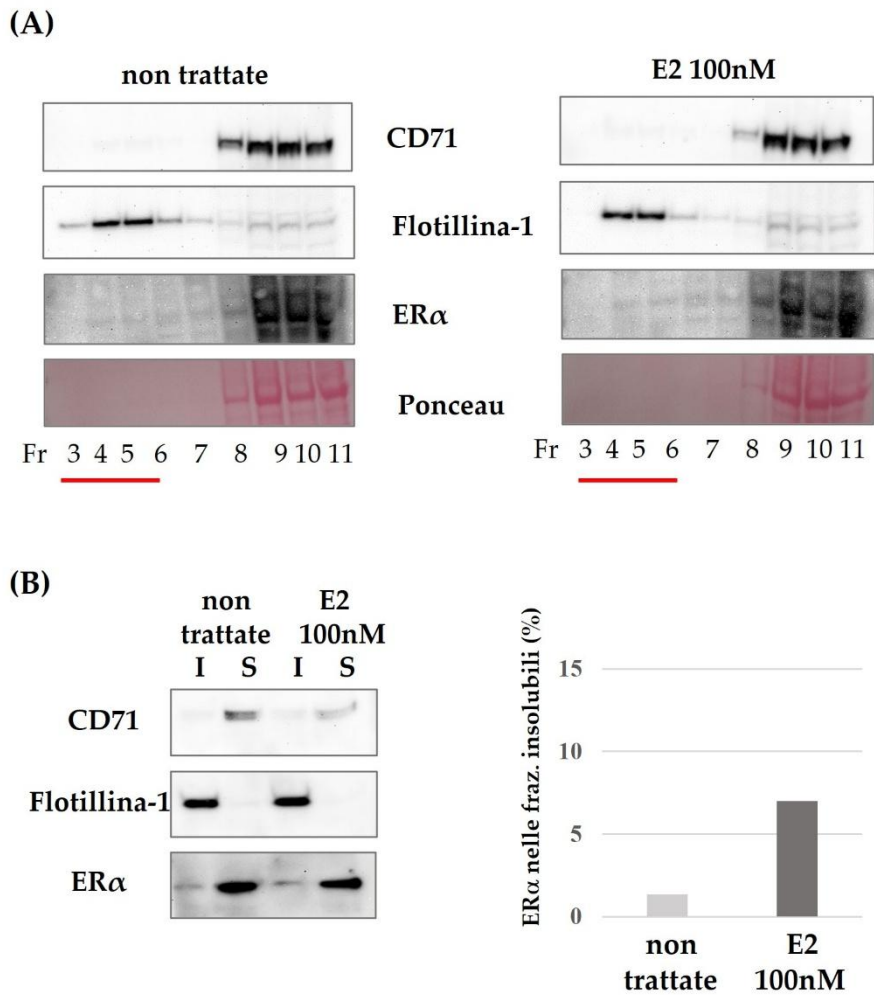


Figura 5. Il trattamento con E2 determina uno spostamento di ER α nei *lipid rafts* delle DC.

(A) Le DC non trattate (pannello a sinistra) e trattate con E2 a 100 nM per 10 min (pannello a destra) sono state lisate con tampone di lisi contenente Triton X-100 e sottoposte a gradiente di saccarosio. I gradienti sono stati aliquotati in 12 frazioni. Le frazioni dalla 3 alla 11 sono state caricate volumetricamente (40 μ l per frazione) su SDS-PAGE. Il *ponceau* mostra la distribuzione delle proteine nel gradiente. L'espressione di ER α , CD71 e Flotillina-1 è stata analizzata per immunoblotting usando i rispettivi anticorpi specifici. La Flotillina-1 è stata utilizzata come marker delle frazioni Triton insolubili, corrispondenti ai *lipid rafts*, mentre il recettore per la transferrina (CD71) è stato utilizzato come marker di controllo per le frazioni Triton solubili. (B) Per ciascun gradiente sono state unite le frazioni 3,4,5,6 corrispondenti alle frazioni Triton insolubili (I) e le frazioni 8,9,10,11 corrispondenti alle frazioni Triton solubili (S) quindi la stessa quantità di proteine è stata caricata ed analizzata per Western Blot. Il grafico a destra mostra l'analisi

densitometrica dell'espressione di ER α nelle frazioni I corrispondenti ai *lipid rafts* effettuata mediante il programma Image J.

Il trattamento con E2 non altera il differenziamento e la maturazione delle DC umane

In linea con gli obiettivi stabiliti, è stato analizzato l'effetto dell'E2 sia sul processo di differenziamento dei monociti in cellule dendritiche (DC), che sulla maturazione delle DC indotta da LPS. Le analisi eseguite al citofluorimetro evidenziano che l'aggiunta di E2 al tempo zero, insieme al cocktail di differenziamento contenente IL-4 e GM-CSF, non modifica l'espressione in membrana di CD1a, CD14, delle molecole costimolatorie (CD80 e CD86) né delle molecole di presentazione dell'antigene MHC di I e II classe (Figura 6). Analogamente, in presenza di LPS, l'espressione delle molecole esaminate rimane invariata nonostante il trattamento con E2, suggerendo che l'estrogeno non interferisce con i *pathways* di segnalazione coinvolti nel differenziamento cellulare (Figura 6).

(A)

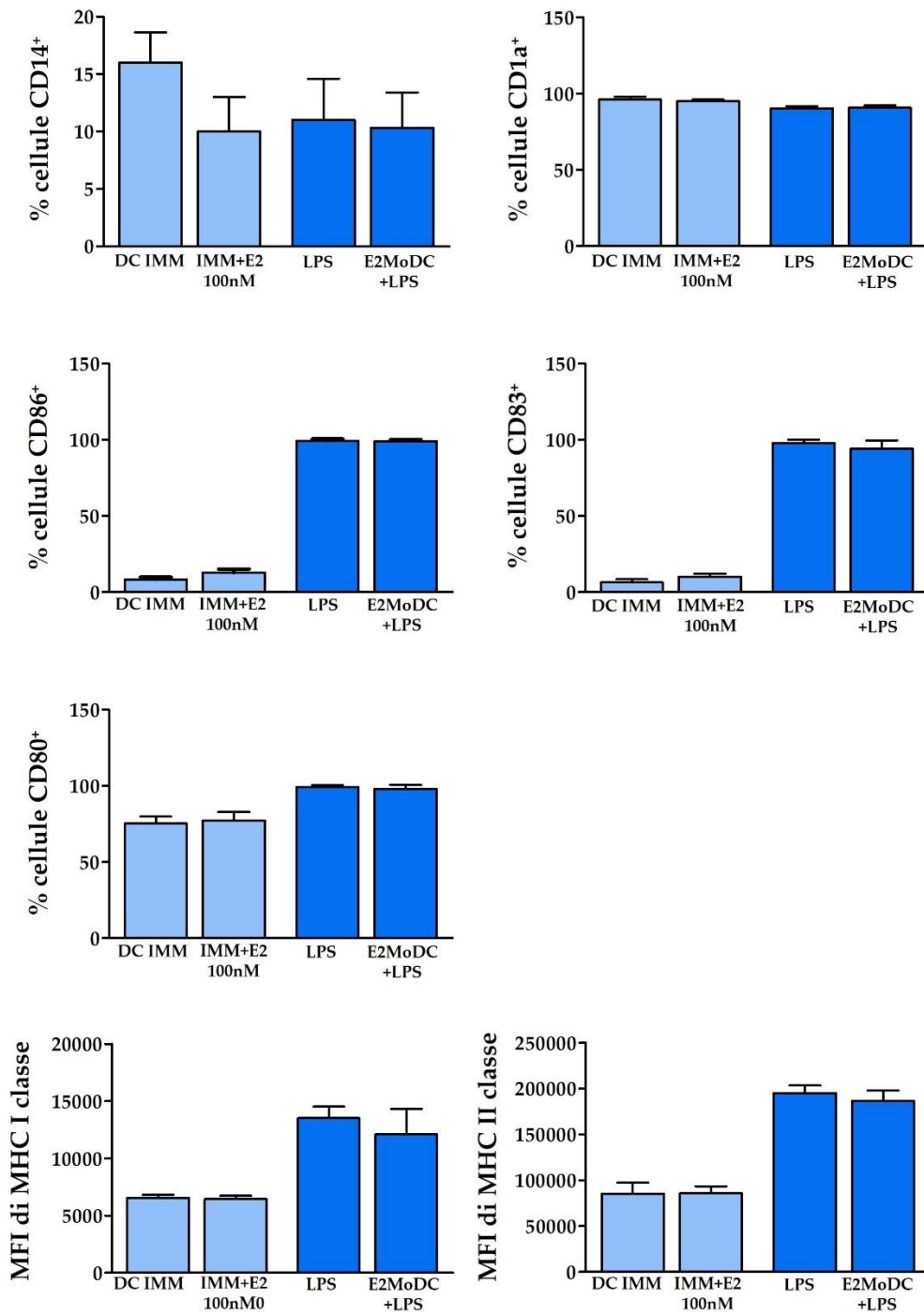


Figura 6. Il trattamento con E2 a 100nM non altera il differenziamento e la maturazione delle DC.

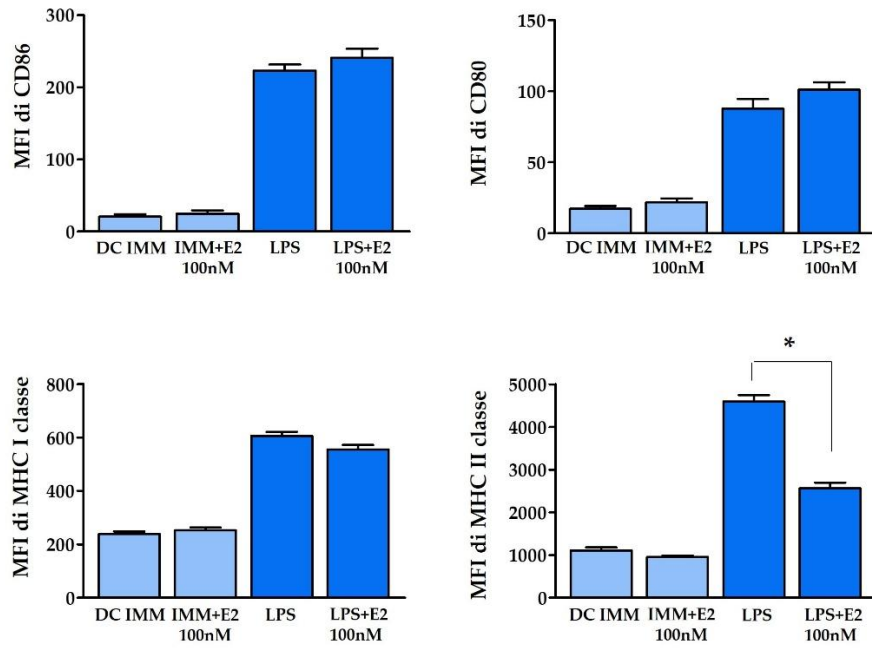
(A) I livelli di espressione in membrana delle molecole CD14, CD1a, CD83, CD80 e CD86 e MHC di I e II classe sono state analizzate mediante citofluorimetria.

L'analisi è stata eseguita misurando l'espressione delle suddette molecole nelle DC immature (DC IMM) o immature trattate con E2 (IMM+E2 100nM) aggiunto al tempo zero insieme al cocktail di differenziamento contenente IL-4 + GM-CSF. L'analisi è stata inoltre eseguita su DC stimulate con LPS (LPS) o trattate con E2 a 100 nM da giorno 0 e poi maturate con LPS (E2Mo-DC+LPS) aggiunto al quinto giorno di coltura. I grafici riportano i valori della percentuale (%) di cellule positive e/o dell'intensità media di fluorescenza (*mean fluorescence intensity*, MFI) relativa all'espressione delle molecole marcate con anticorpo specifico. I risultati mostrati sono riportati come media aritmetica \pm DS relativa a 10 donatori sani analizzati.

Il trattamento con E2 inibisce l'up-regolazione delle molecole MHC di II classe ma non altera la produzione di citochine indotte dalla maturazione delle DC con LPS

È stato analizzato l'effetto di E2 sulle DC già differenziate, valutandone sia il fenotipo sia la produzione di citochine dopo stimolazione con E2 e con E2+LPS al quinto giorno di coltura. L'analisi citofluorimetrica mostra che l'E2 a 100nM, *per se*, non induce la maturazione delle DC in termini di up-regolazione in membrana delle molecole co-stimolatorie CD80, CD86 e delle molecole MHC di I e II classe. In presenza di LPS, invece, l'E2 inibisce significativamente l'up-regolazione di membrana delle molecole MHC di classe II (cellule trattate *versus* cellule non trattate, $P = 0.02$, Figura 7A). Per quanto riguarda la produzione di citochine da parte delle DC maturate con LPS, l'analisi condotta tramite saggio CBA indica che il trattamento con E2 non modifica i livelli di citochine (IL-12, IL-10, TNF- α , IL-10) rilasciate dalle DC stimulate con E2 o con E2+LPS (Figura 7B).

(A)



(B)

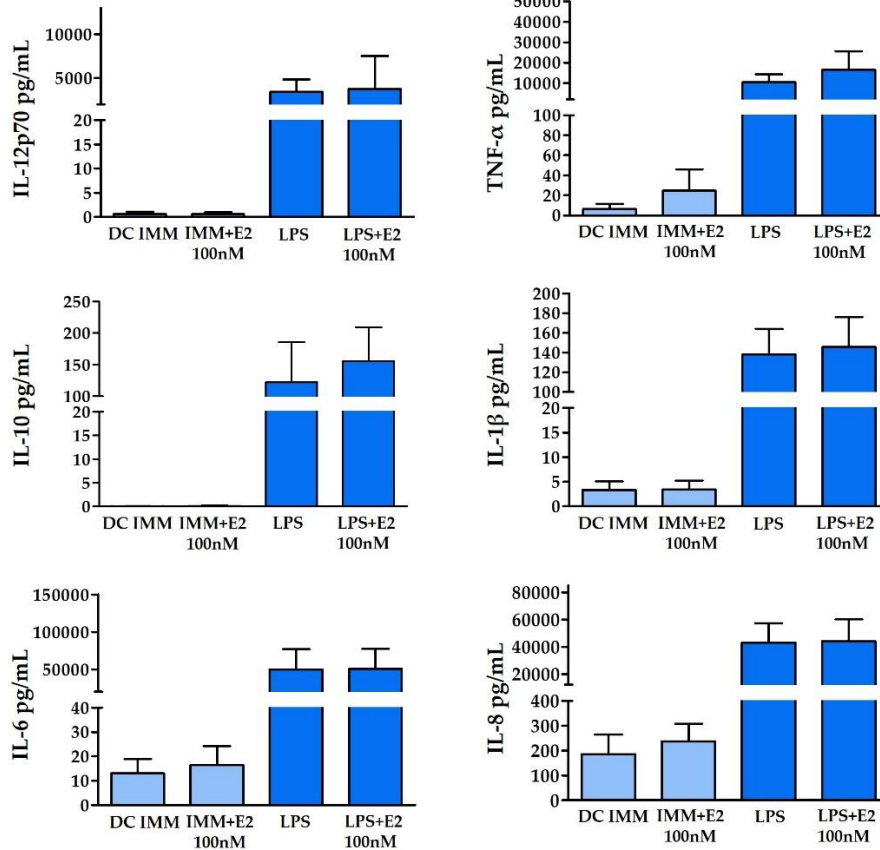


Figura 7. Il trattamento con E2 a 100nM down-regola l'espressione dell'MHC di II classe senza influenzare la produzione di citochine da parte delle DC maturate con LPS.

(A) I livelli di espressione di membrana delle molecole co-stimolatorie (CD80 e CD86) e delle molecole MHC di I e II classe sono stati valutati mediante analisi citofluorimetrica, misurandone l'espressione nelle DC non stimolate (DC IMM) o stimolate con E2 (IMM+E2 100nM) o con E2+LPS per 24 ore. I grafici riportano i valori dell'intensità media di fluorescenza (*mean fluorescence intensity*, MFI), indicativa dell'espressione delle molecole marcate con anticorpo specifico. (B) La produzione delle citochine prodotte dalle DC non stimolate, stimolate con E2 o con E2+LPS per 24 ore è stata valutata mediante il kit CBA Human Inflammation. I grafici illustrano i valori della concentrazione della singola citochina analizzata espressa in pg/mL. (A, B) I risultati mostrati sono riportati come media aritmetica \pm DS relativa a 10 donatori sani analizzati. *, $P < 0.05$ DC mature + E2 *versus* DC mature.

Il trattamento con E2 inibisce la proliferazione dei linfociti T umani e la produzione di citochine pro-infiammatorie in risposta a DC allogeniche maturate con LPS

Per verificare se l'inibizione dell'up-regolazione dell'MHC di II classe avesse un impatto funzionale sulla capacità delle DC di presentare l'antigene ai linfociti T, abbiamo eseguito una MLR in cui DC stimolate e non con LPS, in presenza o assenza di E2 sono state messe in coltura con linfociti T allogenici marcati con CFSE (Figura 8A). L'analisi citofluorimetrica mostra che le DC maturate con LPS+E2 riducono la proliferazione dei linfociti T allogenici (Figura 8B), suggerendo che l'inibizione dell'up-regolazione dell'MHC di II classe mediata da E2 limita la presentazione degli alloantigeni e, di conseguenza, la risposta T antigene-specifica.

È stato, inoltre, valutato l'effetto di E2 sulla produzione di citochine da parte dei linfociti T allogenici, analizzando tramite saggio CBA le citochine rilasciate dai T all'interno dell'MLR (vedi Materiali e Metodi). I risultati indicano che E2 riduce in modo significativo la produzione di IL-17, TNF α e IL-6 rispetto alle cellule non trattate con l'estrogeno (IL-17, cellule trattate *versus* non trattate, $P = 0.02$; TNF α , cellule trattate *versus* non trattate, $P = 0.02$; IL-6, cellule trattate *versus* non trattate, $P = 0.02$ Figura 9). Non sono emerse variazioni significative nei livelli produzione di IL-4 e IFN- γ .

Questi dati confermano che la quantità di antigene presentato non rappresenta solo un parametro quantitativo, ma contribuisce a determinare qualitativamente il tipo di risposta immunitaria, influenzando in particolare il profilo citochinico e la polarizzazione dei linfociti T.

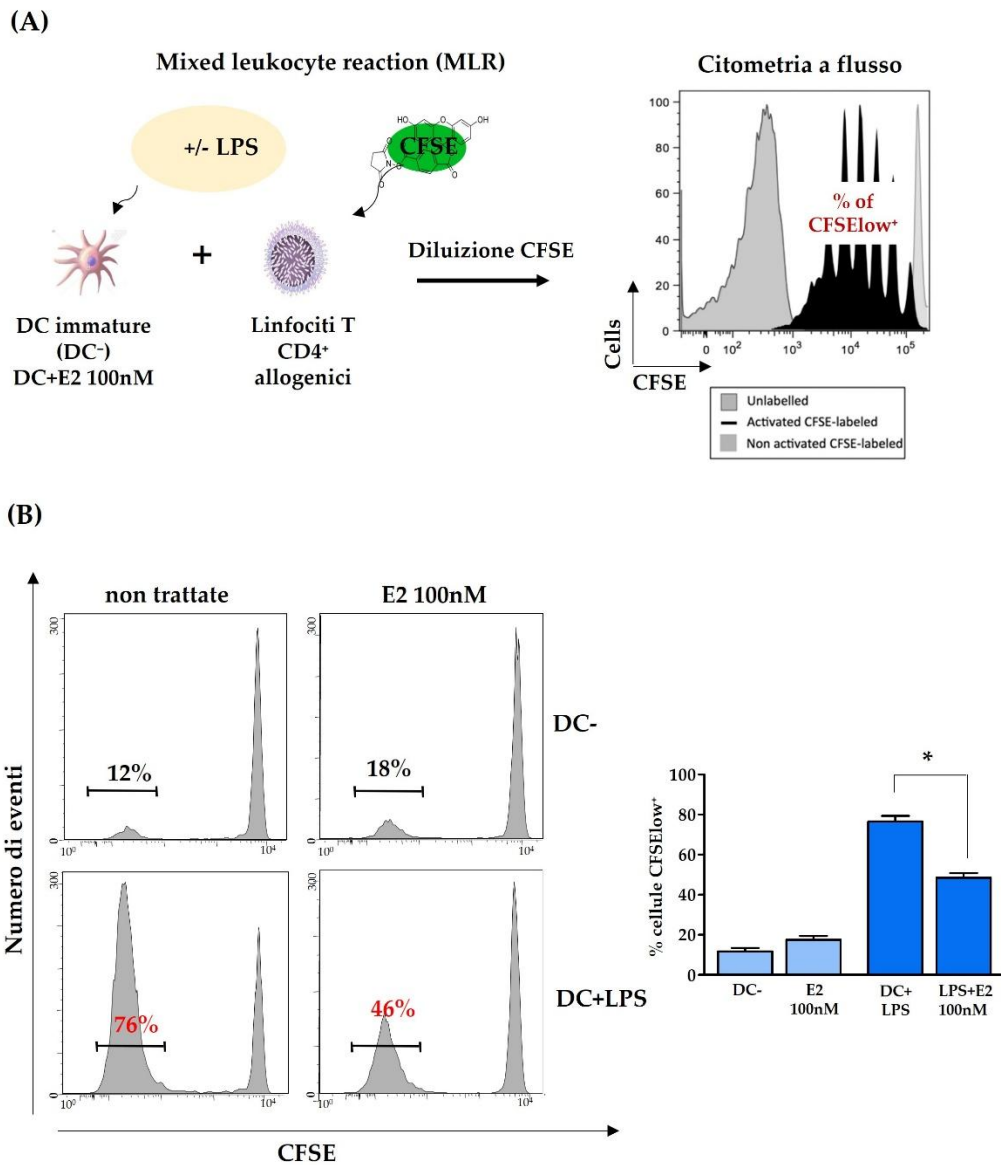


Figura 8. Il trattamento con E2 delle DC inibisce la proliferazione di linfociti T allogeici in una MLR.

(A) Schema rappresentativo del protocollo di esecuzione di un MLR. (B) I risultati ottenuti da un esperimento rappresentativo dell'MLR eseguito su DC stimulate e non con LPS, in presenza o assenza di E2 (100 nM) per 24 ore sono messe in coltura con linfociti T allogeici marcati con CFSE. L'analisi eseguita al citofluorimetro mostra la percentuale (%) di cellule CFSE^{low+} indicativa della proliferazione cellulare. Nel pannello in alto sono mostrate le DC non stimulate (DC-) ed in basso le DC stimulate con LPS (LPS). Come si vede dall'immagine, le DC immature (DC-) trattate e non con E2 ad alta concentrazione non inducono proliferazione dei linfociti T allogeici. Diversamente, le DC maturate con LPS (DC+LPS) inducono una forte proliferazione di linfociti T allogeici che viene inibita dalla presenza di

E2 a 100nM durante la stimolazione con LPS della DC. (C) Il grafico riporta i valori della % di cellule proliferanti CFSElow⁺. I risultati mostrati sono riportati come media aritmetica \pm DS relativa a 5 esperimenti indipendenti eseguiti. *, $P < 0.05$ DC mature + E2 (LPS+E2) *versus* DC mature (LPS).

(A)

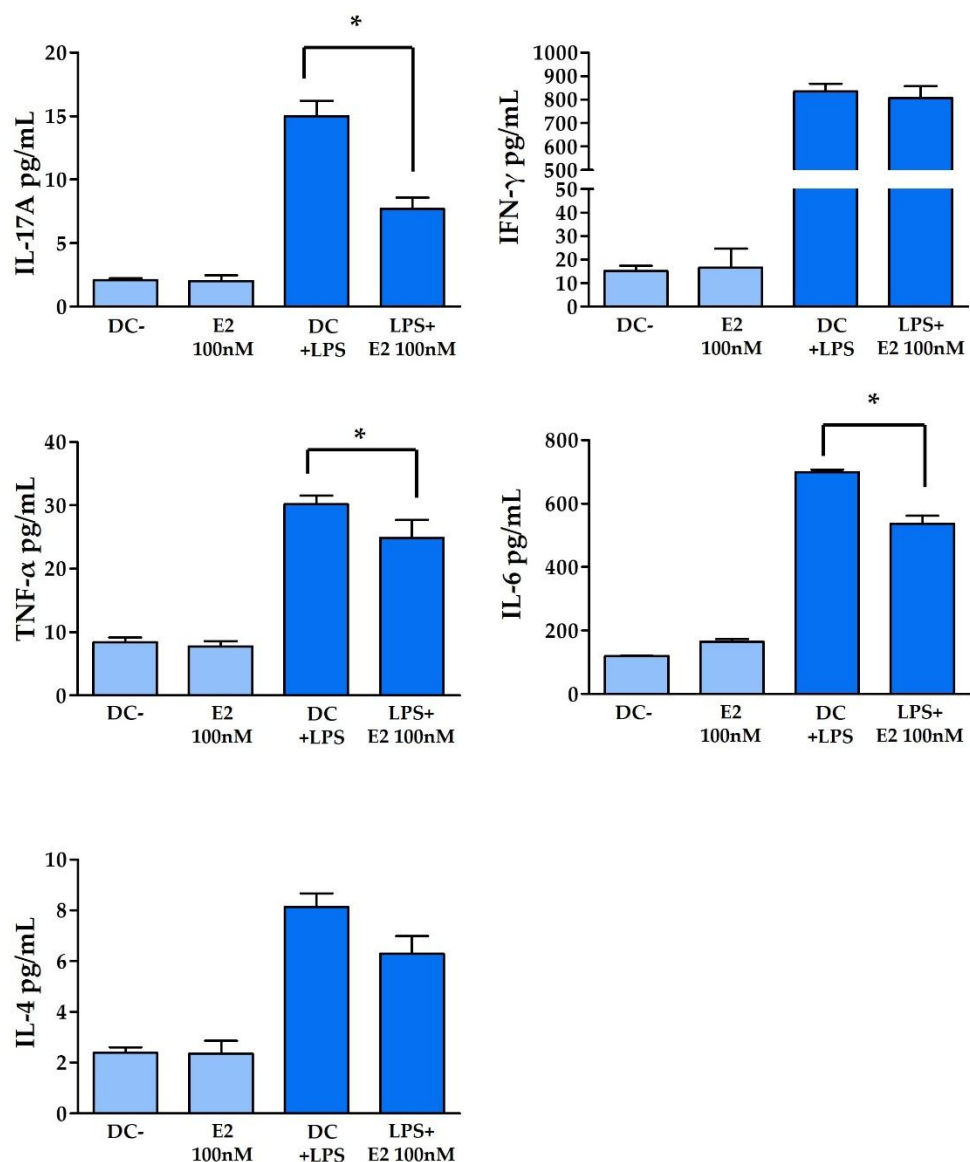


Figura 9. Il trattamento ad alta concentrazione con E2 inibisce la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte dei linfociti T in risposta a DC allogeneiche maturate con LPS.

La produzione delle citochine prodotte dai linfociti T in risposta a DC allogeneiche non stimolate, stimolate con E2 o con E2+LPS per 24 ore è stata valutata mediante lo Human Th1/Th2/Th17 CBA Kit. I grafici illustrano i valori della concentrazione della singola citochina analizzata espressa in pg/mL. I risultati mostrati sono riportati come media aritmetico \pm DS relativa a 5 esperimenti indipendenti eseguiti. *, $P < 0.05$ DC allogeneiche maturate con LPS + E2 *versus* DC allogeneiche maturate con LPS.

Le iNKT umane esprimono ER α e ER β ed il trattamento con E2 ne inibisce la risposta antigene specifica

Studi *in vivo* e *in vitro* su cellule iNKT murine hanno dimostrato che gli estrogeni sono in grado di potenziare la produzione di IFN- γ attraverso l'attivazione del recettore ER α (186, 187). L'espressione di ER α in queste cellule è stata confermata mediante RT-PCR, mentre, ad oggi, la presenza di tali recettori nelle iNKT umane non è stata ancora investigata.

In questo studio sono state innanzitutto identificate le cellule iNKT umane nel sangue periferico di donatori sani mediante analisi multiparametrica al citofluorimetro al tempo 0 e dopo 13 giorni di espansione con l'antigene α -GalCer. Tale analisi ha consentito di distinguere le quattro sottopopolazioni descritte in letteratura in base all'espressione delle molecole di superficie CD4 e/o CD8 (Figura 10). L'espansione delle iNKT umane con α -GalCer ha permesso di valutare l'espressione dei recettori evidenziando per la prima volta che le iNKT umane esprimono entrambi i recettori ER α e ER β a livello intracellulare (Figura 11A).

Per quanto riguarda l'effetto funzionale di E2, a differenza di quanto osservato nel modello murino, il trattamento delle iNKT umane con l'estrogeno, ad una concentrazione paragonabile a quella osservata nelle donne in gravidanza, induce una significativa riduzione della risposta antigene-specifica verso l' α -GalCer (cellule trattate *versus* non trattate, $P = 0.002$, Figura 11B). Tale trattamento, tuttavia, non altera la distribuzione relativa delle diverse sottopopolazioni iNKT (Figura 11C). Nel complesso, questi risultati aprono un nuovo scenario interpretativo sul ruolo degli estrogeni nella regolazione delle cellule iNKT, suggerendo che tali ormoni possano contribuire al dimorfismo sessuale osservato nelle malattie

autoimmuni e infettive attraverso la modulazione diretta delle funzioni delle iNKT.

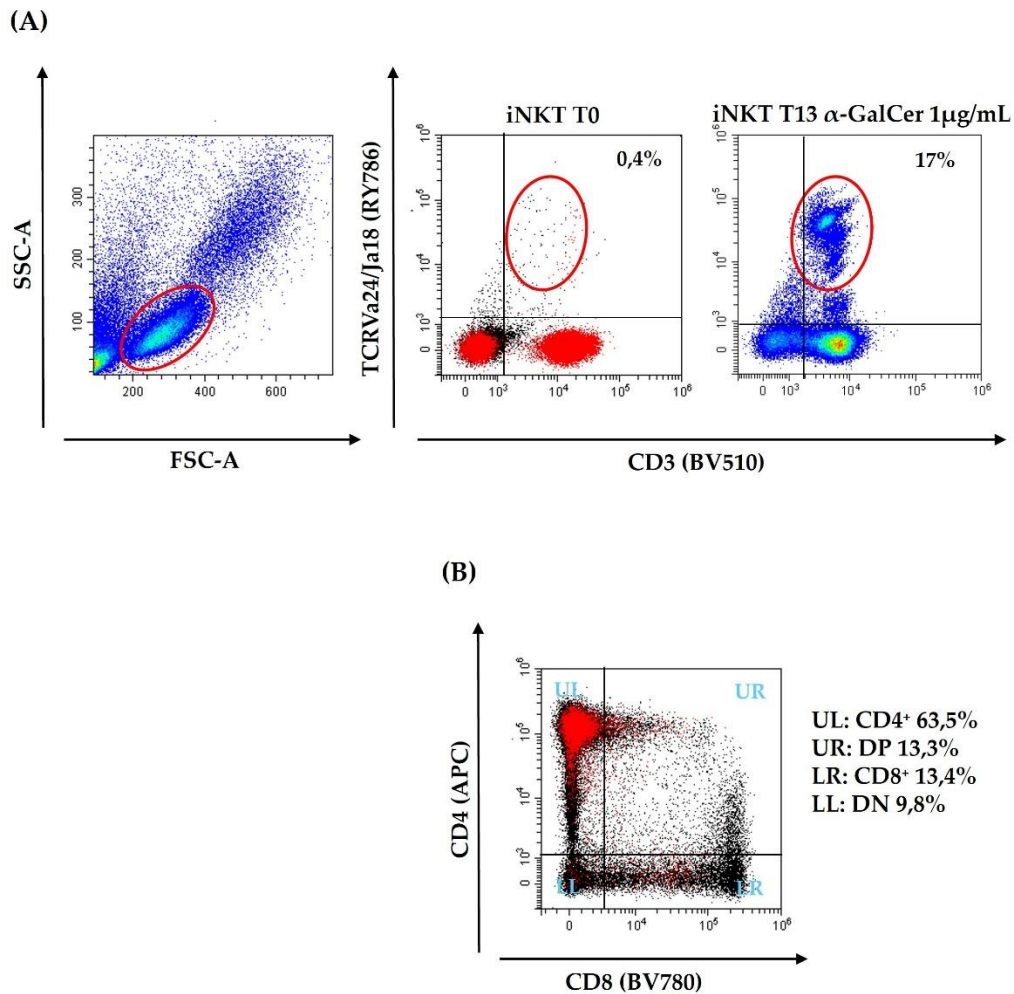


Figura 10. Identificazione delle iNKT da sangue periferico di donatori sani e loro espansione con α -GalCer.

(A) L'identificazione delle iNKT umane è stata eseguita mediante analisi multiparametrica al citofluorimetro al tempo 0 e dopo espansione con α -GalCer alla concentrazione di $1\mu\text{g}/\text{mL}$ al tredicesimo giorno di coltura. I numeri riportati indicano la percentuale di cellule iNKT che esprimono CD3 e TCRV α 24/J α 18. (B) L'analisi multiparametrica eseguita al citofluorimetro ha permesso di identificare le quattro sottopopolazioni note in letteratura: upper left (UL), CD4⁺ 63,4%; upper right (UR), doppia positiva (DN) 13,3%; lower right (LR), CD8⁺ 13,4%; lower left (LL), doppia negativa (DN) 9,8%.

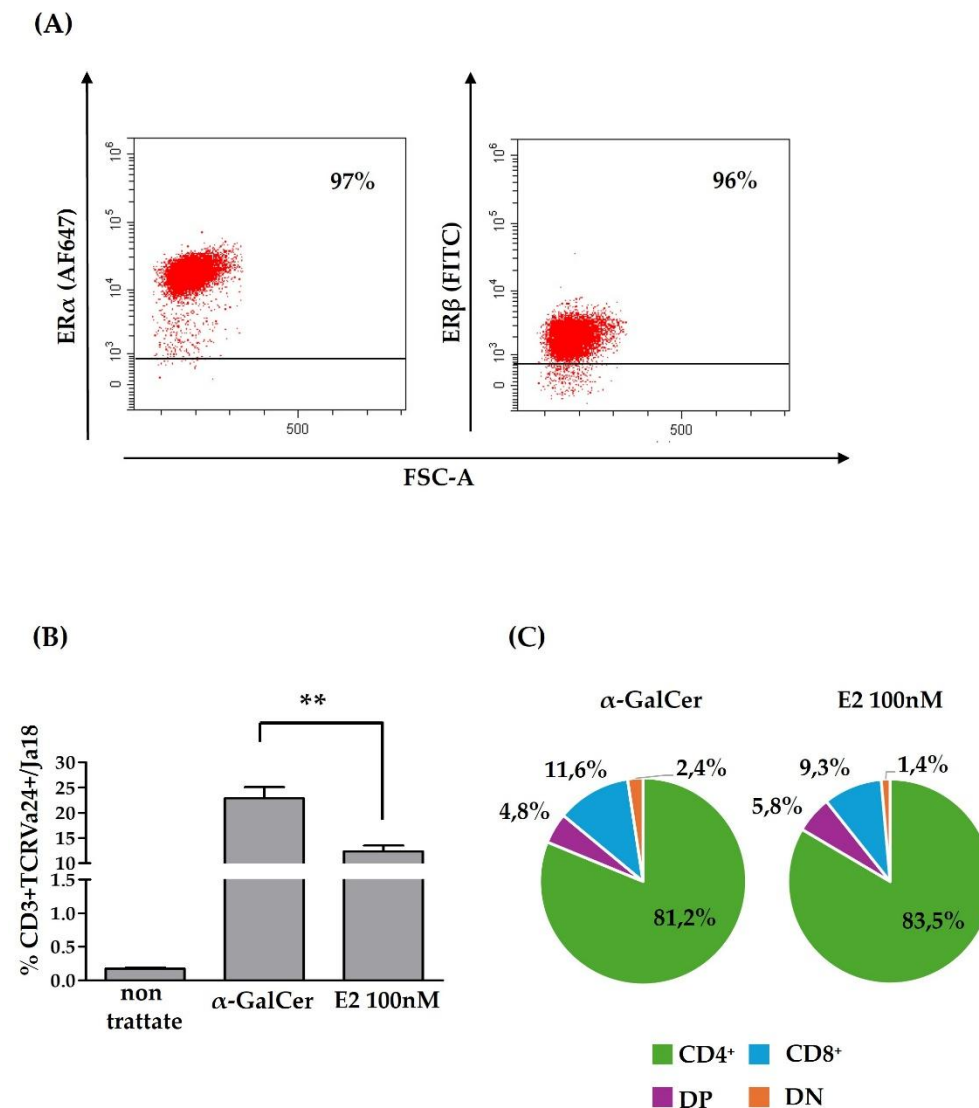


Figura 11. Le iNKT umane esprimono ER α e ER β a livello intracellulare: il trattamento con E2 ad alta concentrazione inibisce la risposta antigene specifica. (A) L'espressione dei recettori ER α ed ER β è stata valutata mediante analisi multiparametrica al citofluorimetro, esaminandone i livelli intracellulari nelle iNKT umane espanse con α -GalCer (1 μ g/mL) al tredicesimo giorno di coltura. I valori riportati nei dot plot rappresentano la percentuale (%) di cellule positive per le molecole marcate con anticorpi specifici. (B) Il grafico riporta la percentuale di iNKT CD3+/TCR-V α 24/J α 18 nelle cellule non trattate e in quelle stimulate con α -GalCer in presenza e/o assenza di E2 alla concentrazione di 100 nM. **, $P < 0.01$ E2 100 nM *versus* α -GalCer. (C) I grafici mostrano le percentuali delle singole sottopopolazioni di iNKT antigene-specifiche trattate o non trattate con E2 alla concentrazione di 100 nM.

DISCUSSIONE

Gli ormoni sessuali, e in particolare gli estrogeni, svolgono un ruolo cruciale nella regolazione del sistema immunitario, contribuendo in modo significativo al dimorfismo sessuale osservato sia nelle malattie autoimmuni sia nelle infezioni e nella risposta alle vaccinazioni. In generale, le donne presentano risposte immunitarie innate e adattative più forti rispetto agli uomini, con una più efficace fagocitosi e presentazione antigenica, una più forte produzione di citochine infiammatorie, un numero più elevato di linfociti T CD4⁺ e livelli più alti di anticorpi circolanti (188, 189).

Numerosi studi hanno evidenziato che gli ormoni sessuali, in particolare l'E2, modulano l'attività delle cellule immunitarie attraverso meccanismi sia genomici, mediati dalla regolazione trascrizionale attraverso i recettori nucleari ER α ed ER β , sia non genomici, caratterizzati da risposte rapide dipendenti dall'attivazione di *pathways* di segnalazione intracellulare come PI3K/AKT, Src e MAPK/ERK (129, 130, 188). Gli estrogeni possono esercitare effetti sia immunostimolanti sia immunosoppressivi, a seconda della loro concentrazione, del recettore e del tipo cellulare coinvolto (188).

Tuttavia, la maggior parte delle conoscenze deriva da studi condotti in modelli murini o su linee cellulari, mentre i meccanismi attraverso cui l'E2 agisce sulle cellule immunitarie umane, e soprattutto sulle cellule T, DC derivate da monociti e iNKT, risultano ancora poco indagati.

Nei presenti esperimenti, la concentrazione di E2 utilizzata (100 nM) corrisponde a quella osservata durante la gravidanza, molto superiore ai livelli fisiologici pre-ovulatori o luteali, e rappresenta quindi condizioni in cui l'estradiolo esercita un marcato effetto immunosoppressivo. Il ruolo immunosoppressivo degli estrogeni in gravidanza è noto e ampiamente

descritto come uno dei meccanismi che consentono la tolleranza materno-fetale; tuttavia, i meccanismi cellulari e molecolari che mediano questo effetto nelle cellule immunitarie umane non sono ancora del tutto chiariti. Il nostro lavoro ha quindi voluto esplorare più in profondità questi *pathways*, con l'obiettivo non solo di comprendere la fisiologia immunitaria della gravidanza, ma anche di valutare se tali meccanismi possano rappresentare un modello utile per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nelle malattie immunomediate, incluse possibili applicazioni di fitoestrogeni o agonisti selettivi dei recettori estrogenici.

I risultati confermano che i linfociti T umani esprimono entrambi i recettori ER α e ER β a livello intracellulare. Dato interessante, è che la stimolazione con anticorpo anti-CD3, che mima la stimolazione del TCR, induce l'up-regolazione selettiva di ER α , ma non di ER β . Ciò suggerisce che l'espressione di ER α possa essere modulata in risposta all'attivazione delle cellule T. Sebbene tale risultato differisca da quanto riportato da Phiel et al. (34), esso risulta coerente con evidenze ottenute su cellule murine, dove la stimolazione del TCR regola l'espressione di ER α (190). Una possibile spiegazione di tale discrepanza può essere attribuita alla diversa modalità di attivazione cellulare: Phiel e colleghi utilizzano la fitoemoagglutinina (PHA), un mitogeno aspecifico, mentre nel presente lavoro l'attivazione è stata indotta tramite il *cross-linking* del TCR con anticorpo anti-CD3.

Un risultato di particolare interesse riguarda la localizzazione di ER α nei *lipid rafts* in seguito al trattamento con E2. I *lipid rafts* sono microdomini dinamici delle membrane cellulari che funzionano come piattaforme di organizzazione per la segnalazione. La localizzazione di ER α nei *lipid rafts* è stata precedentemente descritta in neuroni, piastrine, cellule endoteliali e nei linfociti T umani, dove la sua associazione con la caveolina e con diverse

chinasi di membrana promuove la trasduzione di segnali non genomici (175-177, 181). Tuttavia, la capacità di E2 di influenzare la distribuzione intracellulare di ER α nelle cellule immunitarie umane non era mai stata precedentemente descritta. La dimostrazione che ER α , ma non ER β , si localizza nei *lipid rafts* dopo stimolazione con E2 a concentrazioni gravidiche suggerisce che le cellule T umane possano rispondere all'ormone attraverso meccanismi rapidi e non genomici, rilevanti per la modulazione dell'attivazione linfocitaria.

Dal punto di vista funzionale, i dati mostrano che l'E2 riduce in modo significativo la produzione di citochine pro-infiammatorie quali TNF- α e IL-17 nei linfociti CD4⁺, e IFN- γ nei CD8⁺. Questi risultati confermano il ruolo immunosoppressivo di E2 a livelli osservati in gravidanza, in accordo con studi sull'uomo e sul topo, secondo cui l'E2 riduce la produzione di citochine Th1 e Th17, promuovendo un profilo immunitario più regolatorio (129, 191). L'attenuazione selettiva delle risposte Th17 e Th1 suggerisce che l'E2 possa contribuire alla minore severità di alcune patologie infiammatorie durante la gravidanza, mentre la disregolazione di questi *pathways* potrebbe favorire l'insorgenza o l'aggravamento di condizioni autoimmuni come il LES.

Analogamente, nelle DC umane si osserva un incremento significativo dei livelli di ER α e una riduzione di ER β durante il differenziamento da monociti, suggerendo un ruolo predominante di ER α nello sviluppo delle DC (183, 185). Tuttavia, il trattamento con E2 ad alta concentrazione non altera il differenziamento fenotipico delle DC, mentre nelle DC già differenziate inibisce selettivamente l'up-regolazione delle molecole MHC di II classe indotta da LPS e riduce la capacità di stimolare la proliferazione dei linfociti T allogenici in un MLR, senza modificare la produzione di

citochine nelle DC. Questo suggerisce un effetto mirato sulla funzione di presentazione dell'antigene piuttosto che su quella secretoria.

Infine, le iNKT umane, caratterizzate da una risposta rapida agli stimoli antigenici, esprimono entrambi i recettori ER α ed ER β , e il trattamento con E2 ad alta concentrazione riduce significativamente la risposta antigene-specifica verso l' α -GalCer, senza alterare la distribuzione delle sottopopolazioni. Tuttavia, non è da escludere che l'effetto osservato possa dipendere da un effetto indiretto dell'E2 sulle APC presenti in coltura e non solo sulle iNKT. Un ruolo degli estrogeni nella modulazione della risposta iNKT è già stato dimostrato in un modello murino in cui l'estradiolo promuove la produzione di IFN- γ indotta da α -GalCer ma non modifica la produzione di IL-4 sia *in vivo* che *in vitro* nei topi femmine e non nei topi maschi. Questo effetto è abolito nei topi con deficit del recettore degli estrogeni α (ER α -/-) (186). Ma nell'uomo l'interazione tra estrogeni e iNKT non è stata ancora indagata. Questi dati aprono nuovi scenari sugli effetti degli estrogeni sulle iNKT umane e sul dimorfismo sessuale nella risposta immunitaria, considerando le varie funzioni regolatorie che le iNKT possono svolgere durante la fase effettrice delle risposte immunitarie.

Nel complesso, i risultati evidenziano che le concentrazioni di estradiolo utilizzate, equivalenti a quelle fisiologiche osservate durante la gravidanza, esercitano un marcato effetto immunomodulatorio e immunosoppressivo sulle cellule T, DC e iNKT umane (Figura 12).

Uno studio precedente ha rilevato che le giovani donne che assumevano contraccettivi orali mostravano tassi più bassi di ospedalizzazione per COVID-19(192). Inoltre, ampie coorti osservazionali hanno suggerito che, nelle donne in post-menopausa affette da COVID-19, l'uso di terapia estrogenica è associato a una riduzione del rischio di mortalità (193-195).

Chiarire i meccanismi attraverso cui ciò avviene può contribuire non solo a comprendere la fisiologia immunitaria della gestazione, ma anche a identificare *pathways* bersaglio sfruttabili per nuove strategie terapeutiche nelle malattie immunomediate e nelle infezioni, inclusa la possibile modulazione farmacologica tramite fitoestrogeni o selettivi agonisti estrogenici.

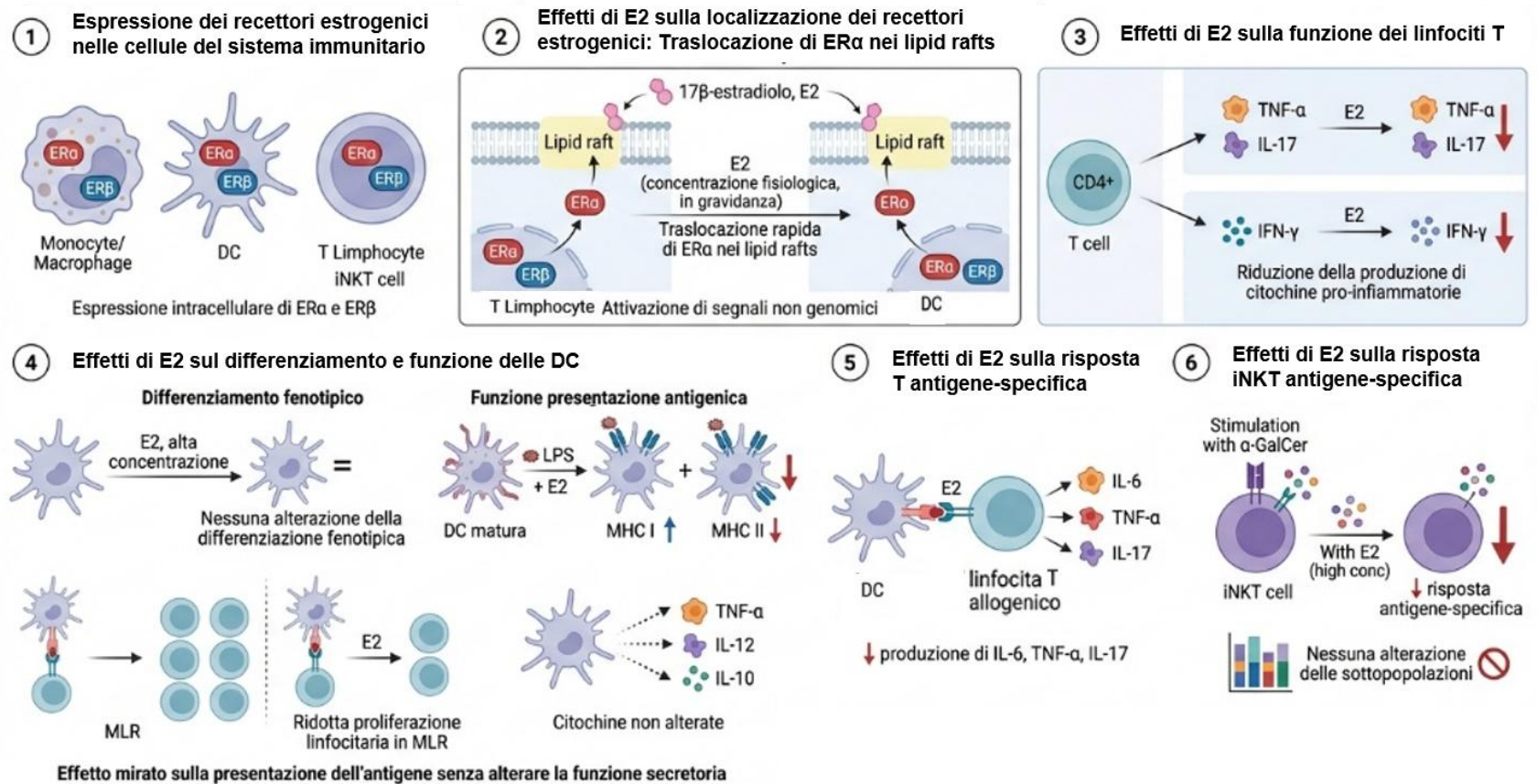


Figura 12. Graphical abstract dei principali risultati ottenuti nel progetto di ricerca.

L'E2 modula la risposta immunitaria attraverso effetti diretti e indiretti su diverse popolazioni cellulari del sistema immunitario. (1) I recettori estrogenici ER α ed ER β sono espressi a livello intracellulare nei monociti, cellule dendritiche (DC), linfociti T convenzionali e cellule iNKT. (2) A concentrazioni fisiologiche tipiche della gravidanza, E2 induce una rapida traslocazione di ER α nei *lipid rafts* dei linfociti T e DC. (3) Nei linfociti T CD4⁺, E2 riduce la produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α e IL-17) e di IFN- γ nei linfociti T CD8⁺. (4)

E2 non altera il differenziamento fenotipico delle DC né la loro funzione secretoria, ma modula selettivamente la presentazione dell'antigene, riducendo l'up-regolazione dell'espressione delle molecole MHC di II classe e la risposta T antigene-specifica con (5) conseguente riduzione della produzione di IL-6, TNF- α e IL-17 da parte di linfociti T allogenici. (6) Analogamente, E2 ad alte concentrazioni riduce la risposta iNKT antigene-specifica senza alterarne la distribuzione delle sottopopolazioni. Nel complesso, i risultati evidenziano un ruolo immunomodulante di E2, caratterizzato da un effetto mirato sulla presentazione dell'antigene e sulla funzione effettrice delle cellule T.

LISTA ABBREVIAZIONI

AF, Alexa Fluor; AF-1, Activation Function-1; AF-2, Activation Function-2; Akt, Protein Kinase B; AP-1, Activating Protein-1; APC, cellule presentanti l'antigene; APC, aloficocianina; BCR, B Cell Receptors; Breg, linfociti B regolatorio; BV, Brilliant Violet; CFSE, Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester; CBA, Cytometric Bead Array; cDC, cellule dendritiche convenzionali; CSLM, Confocal Scanning Laser Microscopy; COVID-19, COroNaVirus Disease-19; CTB, subunità B della tossina colerica; CTL, linfociti T citotossici; DAMPs, Damage-Associated Molecular Patterns; DBD, DNA Binding Domain; DC, cellule dendritiche; DC IMM, cellule dendritiche immature; DN, doppie negative; DP, doppie positive; DS, deviazione standard; E2, 17 β -estradiolo; E3, estriolo; ER, Estrogen Receptor; ERE, Estrogen Response Elements; ERK, Extracellular signal-Regulated Kinase; EtOH, etanolo; FBS, Fetal Bovine Serum; FITC, fluoresceina isotiocianato; FSC, Forward Scatter; GM-1, ganglioside-1; GPI, glicosilfosfatidilinositolo; Hsp, Heat Shock Protein; IFN, interferone; IL, interleuchina; iNKT, invariant Natural Killer T cells; LBD, Ligand Binding Domain; LES, Lupus Eritematoso Sistemico; LPS; lipopolisaccaride batterico; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase; mER, membrane Estrogen Receptor; MFI, Mean Fluorescence Intensity; MHC, Major Histocompatibility Complex; MLR, Mixed Lymphocyte Reaction; NETs, Neutrophil Extracellular Traps; NF- κ B, Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NK, Natural Killer cell; NLRs, NOD-Like Receptors; NLS, Nuclear Localization Sequence; PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns; PBMC, cellule mononucleate del sangue periferico; pDC, cellule dendritiche plasmacitoidi; PE, ficoeritrina; PerCP, peridindlorofillina; PHA, fitoemoagglutinina; PI3K, Phosphatidylinositol 3-kinase; PKA, Protein Kinase A; PKC, Protein Kinase C; PMA, forbolo miristato acetato; PRRs, Pattern Recognition Receptors; RLRs, RIG-I-Like Receptors; SP-1, Stimulating Protein-1; SSC, Side Scatter; TCR, T Cell Receptor; TGF, fattore di crescita trasformante; Th, T helper; TLRs, Toll-Like Receptors; TNF, fattore di necrosi tumorale; Treg, linfocita T regolatorio; TRF-1, recettore per la transferrina-1; TX, Triton X-100; WB, Western Blotting; α -GalCer, α -galactosylceramide.

REFERENZE

1. Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2012;135(1):54-70.
2. Gillies GE, McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev.* 2010;62(2):155-98.
3. Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien CA, Bouillon R, et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2017;97(1):135-87.
4. Bereshchenko O, Bruscoli S, Riccardi C. Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. *Front Immunol.* 2018;9:1332.
5. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update.* 2005;11(4):411-23.
6. Laurence L. B, Bjorn C. K. Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutic. 14 ed 2023. 1646 p.
7. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med.* 2006;27(4):299-402.
8. Gui Z, Shi W, Zhou F, Yan Y, Li Y, Xu Y. The role of estrogen receptors in intracellular estrogen signaling pathways, an overview. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2025;245:106632.
9. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology.* 1997;138(11):4613-21.
10. Nilsson S, Koehler KF, Gustafsson J. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(10):778-92.
11. Yakimchuk K, Jondal M, Okret S. Estrogen receptor α and β in the normal immune system and in lymphoid malignancies. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;375(1-2):121-9.
12. Gong Z, Yang S, Wei M, Vlantis AC, Chan JYK, van Hasselt CA, et al. The Isoforms of Estrogen Receptor Alpha and Beta in Thyroid Cancer. *Front Oncol.* 2022;12:916804.
13. Gibson DA, Saunders PT. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues - a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;348(2):361-72.

14. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:335-76.
15. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81(4):1535-65.
16. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 2002;346(5):340-52.
17. Chen P, Li B, Ou-Yang L. Role of estrogen receptors in health and disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:839005.
18. Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(10):477-82.
19. Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007;282(31):22278-88.
20. Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, et al. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev.* 2003;83(3):965-1016.
21. Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wunderlich F. Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. *FEBS Lett.* 1998;422(3):349-53.
22. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol.* 2002;16(1):100-15.
23. Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19(4):833-42.
24. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CC, Levin ER. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50768-75.
25. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol.* 2006;20(9):1996-2009.
26. Pierdominici M, Maselli A, Colasanti T, Giammarioli AM, Delunardo F, Vacirca D, et al. Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. *Immunol Lett.* 2010;132(1-2):79-85.
27. Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(3):878-83.
28. Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, et al. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane

- localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell*. 2005;16(1):231-7.
29. Marino M, Ascenzi P. Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids*. 2008;73(9-10):853-8.
 30. Marino M, Ascenzi P, Acconcia F. S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids*. 2006;71(4):298-303.
 31. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307(5715):1625-30.
 32. Prossnitz ER, Barton M. The G protein-coupled oestrogen receptor GPER in health and disease: an update. *Nat Rev Endocrinol*. 2023;19(7):407-24.
 33. Pernis AB. Estrogen and CD4+ T cells. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19(5):414-20.
 34. Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett*. 2005;97(1):107-13.
 35. Chakraborty B, Byemerwa J, Krebs T, Lim F, Chang CY, McDonnell DP. Estrogen Receptor Signaling in the Immune System. *Endocr Rev*. 2023;44(1):117-41.
 36. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343-53.
 37. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):4-9.
 38. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-84.
 39. Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(9):501-21.
 40. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
 41. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(7):407-20.
 42. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16045.
 43. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016;352(6284):aaf1098.

44. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
45. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762-74.
46. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16-31.
47. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012;53(1-3):41-57.
48. Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkötter C. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol*. 2003;24(4):155-8.
49. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 2011;118(12):e50-61.
50. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445-55.
51. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013;14(10):986-95.
52. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
53. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(6):463-88.
54. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*. 2012;7(12):e50946.
55. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
56. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014;41(1):49-61.
57. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134-47.
58. Zilio S, Serafini P. Neutrophils and Granulocytic MDSC: The Janus God of Cancer Immunotherapy. *Vaccines (Basel)*. 2016;4(3).
59. Cassatella MA, Huber V, Calzetti F, Margotto D, Tamassia N, Peri G, et al. Interferon-activated neutrophils store a TNF-related apoptosis-

- inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) intracellular pool that is readily mobilizable following exposure to proinflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 2006;79(1):123-32.
60. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019;348:1-68.
 61. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.
 62. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154(1):3-20.
 63. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* 2016;37(12):855-65.
 64. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;41:9-22.
 65. Yao V, Platell C, Hall JC. Dendritic cells. *ANZ J Surg.* 2002;72(7):501-6.
 66. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001;193(7):839-46.
 67. Heidkamp GF, Sander J, Lehmann CHK, Heger L, Eissing N, Baranska A, et al. Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Sci Immunol.* 2016;1(6).
 68. Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, et al. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity.* 2017;46(3):504-15.
 69. Kelly A, Fahey R, Fletcher JM, Keogh C, Carroll AG, Siddachari R, et al. CD141⁺ myeloid dendritic cells are enriched in healthy human liver. *J Hepatol.* 2014;60(1):135-42.
 70. Böttcher JP, Reis e Sousa C. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends Cancer.* 2018;4(11):784-92.
 71. Chiang MC, Tullett KM, Lee YS, Idris A, Ding Y, McDonald KJ, et al. Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets. *Eur J Immunol.* 2016;46(2):329-39.
 72. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, Zelante T, Atarashi K, Low D, et al. IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity.* 2013;38(5):970-83.
 73. Bao M, Liu YJ. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell.* 2013;4(1):40-52.
 74. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-

- 12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol.* 2002;169(8):4279-87.
75. Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol.* 2005;174(8):4465-9.
 76. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(7):405-14.
 77. Chen JQ, Szodoray P, Zeher M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;50(1):1-17.
 78. Barrat FJ, Coffman RL. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol Rev.* 2008;223:271-83.
 79. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science.* 2001;294(5546):1540-3.
 80. Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Front Immunol.* 2020;11:924.
 81. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179(4):1109-18.
 82. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011;331(6013):44-9.
 83. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol.* 2018;9:1869.
 84. Bi J, Wang X. Molecular Regulation of NK Cell Maturation. *Front Immunol.* 2020;11:1945.
 85. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S33-40.
 86. Marone G, Schroeder JT, Mattei F, Loffredo S, Gambardella AR, Poto R, et al. Is There a Role for Basophils in Cancer? *Front Immunol.* 2020;11:2103.
 87. Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon HU. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* 2013;34(8):398-409.
 88. Gigon L, Fettlelet T, Yousefi S, Simon D, Simon HU. Eosinophils from A to Z. *Allergy.* 2023;78(7):1810-46.

89. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:891-928.
90. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000;12(2):121-7.
91. Boyce JA. Advances in mast cell biology. *J Allergy Clin Immunol.* 2022;149(6):1919-25.
92. Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol.* 2007;28(5):234-41.
93. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:147-74.
94. Chi H, Pepper M, Thomas PG. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. *Cell.* 2024;187(9):2052-78.
95. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14(Suppl 2):49.
96. Shah DK, Zúñiga-Pflücker JC. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol.* 2014;192(9):4017-23.
97. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity.* 2018;48(2):202-13.
98. Lythe G, Callard RE, Hoare RL, Molina-París C. How many TCR clonotypes does a body maintain? *J Theor Biol.* 2016;389:214-24.
99. Gaud G, Lesourne R, Love PE. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(8):485-97.
100. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis.* 1999;5(4):285-94.
101. Dong C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annu Rev Immunol.* 2021;39:51-76.
102. Medina KL. Overview of the immune system. *Handb Clin Neurol.* 2016;133:61-76.
103. Seiringer P, Garzorz-Stark N, Eyerich K. T-Cell-Mediated Autoimmunity: Mechanisms and Future Directions. *J Invest Dermatol.* 2022;142(3 Pt B):804-10.
104. Khan U, Ghazanfar H. T Lymphocytes and Autoimmunity. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;341:125-68.
105. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):235.
106. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):838-48.
107. Heijink IH, Van Oosterhout AJ. Strategies for targeting T-cells in allergic diseases and asthma. *Pharmacol Ther.* 2006;112(2):489-500.

108. Gonzatti MB, Keller AC. Invariant Natural Killer T lymphocytes as natural sensors for microbes: a two-edged sword in liver diseases. *Front Immunol.* 2025;16:1662906.
109. Hogquist K, Georgiev H. Recent advances in iNKT cell development. *F1000Res.* 2020;9.
110. Rotolo A, Mason NJ, Exley MA. Innate iNKT cells: from biological insight to clinical impact. *Front Immunol.* 2025;16:1653183.
111. Monteiro M, Graca L. iNKT cells: innate lymphocytes with a diverse response. *Crit Rev Immunol.* 2014;34(1):81-90.
112. Bernin H, Fehling H, Marggraff C, Tannich E, Lotter H. The cytokine profile of human NKT cells and PBMCs is dependent on donor sex and stimulus. *Med Microbiol Immunol.* 2016;205(4):321-32.
113. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol.* 2010;11(3):197-206.
114. Chatterjee P, Brahma S, Cresswell P, Bandyopadhyay S. CD1d-iNKT Axis in Infectious Diseases: Lessons Learned From the Past. *Scand J Immunol.* 2025;101(4):e70024.
115. Sahler J, Anannya O, Limper C, Imbiakha B, Pierpont T, August A. Genetic Analysis of iNKT Cell Development and Function. *Methods Mol Biol.* 2021;2388:1-12.
116. Opasawatchai A, Matangkasombut P. iNKT Cells and Their Potential Lipid Ligands during Viral Infection. *Front Immunol.* 2015;6:378.
117. Xin W, Huang B, Chi X, Liu Y, Xu M, Zhang Y, et al. Structures of human $\gamma\delta$ T cell receptor-CD3 complex. *Nature.* 2024;630(8015):222-9.
118. Shiromizu CM, Jancic CC. $\gamma\delta$ T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection. *Front Immunol.* 2018;9:2389.
119. Konigshofer Y, Chien YH. Gammadelta T cells - innate immune lymphocytes? *Curr Opin Immunol.* 2006;18(5):527-33.
120. Althwaiqeb, SA, Fakoya AO, B B. *StatPearls.* 2025.
121. Ollila J, Vihinen M. B cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(3):518-23.
122. Tanaka S, Baba Y. B Cell Receptor Signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1254:23-36.
123. Clark EA, Ledbetter JA. Structure, function, and genetics of human B cell-associated surface molecules. *Adv Cancer Res.* 1989;52:81-149.
124. Brezski RJ, Monroe JG. B-cell receptor. *Adv Exp Med Biol.* 2008;640:12-21.
125. Lanzavecchia A, Sallusto F. Human B cell memory. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(3):298-304.
126. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.

127. Sunderkötter C, Golle L, Pillebout E, Michl C. Pathophysiology and clinical manifestations of immune complex vasculitides. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1103065.
128. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(5):281-94.
129. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol*. 2015;294(2):63-9.
130. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev*. 2007;28(5):521-74.
131. Liao ZH, Huang T, Xiao JW, Gu RC, Ouyang J, Wu G, et al. Estrogen signaling effects on muscle-specific immune responses through controlling the recruitment and function of macrophages and T cells. *Skelet Muscle*. 2019;9(1):20.
132. Kou XX, Li CS, He DQ, Wang XD, Hao T, Meng Z, et al. Estradiol promotes M1-like macrophage activation through cadherin-11 to aggravate temporomandibular joint inflammation in rats. *J Immunol*. 2015;194(6):2810-8.
133. Greaves E, Temp J, Esnal-Zufiurre A, Mechsner S, Horne AW, Saunders PT. Estradiol is a critical mediator of macrophage-nerve cross talk in peritoneal endometriosis. *Am J Pathol*. 2015;185(8):2286-97.
134. Keselman A, Fang X, White PB, Heller NM. Estrogen Signaling Contributes to Sex Differences in Macrophage Polarization during Asthma. *J Immunol*. 2017;199(5):1573-83.
135. Svoronos N, Perales-Puchalt A, Allegrezza MJ, Rutkowski MR, Payne KK, Tesone AJ, et al. Tumor Cell-Independent Estrogen Signaling Drives Disease Progression through Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Discov*. 2017;7(1):72-85.
136. Sorachi K, Kumagai S, Sugita M, Yodoi J, Imura H. Enhancing effect of 17 beta-estradiol on human NK cell activity. *Immunol Lett*. 1993;36(1):31-5.
137. Nadkarni S, McArthur S. Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(4):576-81.
138. Hoffmann JP, Liu JA, Seddu K, Klein SL. Sex hormone signaling and regulation of immune function. *Immunity*. 2023;56(11):2472-91.
139. Zoller AL, Kersh GJ. Estrogen induces thymic atrophy by eliminating early thymic progenitors and inhibiting proliferation of beta-selected thymocytes. *J Immunol*. 2006;176(12):7371-8.

140. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav.* 2012;62(3):263-71.
141. Latham KA, Zamora A, Drought H, Subramanian S, Matejuk A, Offner H, et al. Estradiol treatment redirects the isotype of the autoantibody response and prevents the development of autoimmune arthritis. *J Immunol.* 2003;171(11):5820-7.
142. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42(2):328-37.
143. Browman DT, Resek ME, Zajchowski LD, Robbins SM. Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 15):3149-60.
144. Eberle HB, Serrano RL, Füllekrug J, Schlosser A, Lehmann WD, Lottspeich F, et al. Identification and characterization of a novel human plant pathogenesis-related protein that localizes to lipid-enriched microdomains in the Golgi complex. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 4):827-38.
145. Sobo K, Le Blanc I, Luyet PP, Fivaz M, Ferguson C, Parton RG, et al. Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking. *PLoS One.* 2007;2(9):e851.
146. Dermine JF, Duclos S, Garin J, St-Louis F, Rea S, Parton RG, et al. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem.* 2001;276(21):18507-12.
147. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1341-79.
148. Otto GP, Nichols BJ. The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 23):3933-40.
149. Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol.* 1993;122(4):789-807.
150. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 2002;110(5):597-603.
151. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(1):31-9.
152. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* 2003;161(4):673-7.

153. Laude AJ, Prior IA. Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol.* 2004;21(3):193-205.
154. Bang B, Gniadecki R, Gajkowska B. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2005;14(4):266-72.
155. Rao H, Ma LX, Xu TT, Li J, Deng ZY, Fan YW, et al. Lipid rafts and Fas/FasL pathway may involve in elaidic acid-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells. *J Agric Food Chem.* 2014;62(3):798-807.
156. Scheel-Toellner D, Wang K, Singh R, Majeed S, Raza K, Curnow SJ, et al. The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(4):876-9.
157. Mollinedo F, Gajate C. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. *J Lipid Res.* 2020;61(5):611-35.
158. Mollinedo F, Gajate C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv Biol Regul.* 2015;57:130-46.
159. Pierce SK. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):96-105.
160. Varshney P, Yadav V, Saini N. Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology.* 2016;149(1):13-24.
161. Tsai TH, Chen SF, Huang TY, Tzeng CF, Chiang AS, Kou YR, et al. Impaired Cd14 and Cd36 expression, bacterial clearance, and Toll-like receptor 4-Myd88 signaling in caveolin-1-deleted macrophages and mice. *Shock.* 2011;35(1):92-9.
162. Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(3):557-81.
163. Yokoyama N, Hanafusa K, Hotta T, Oshima E, Iwabuchi K, Nakayama H. Multiplicity of Glycosphingolipid-Enriched Microdomain-Driven Immune Signaling. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17).
164. Rivera J, Arudchandran R, Gonzalez-Espinosa C, Manetz TS, Xirasagar S. A perspective: regulation of IgE receptor-mediated mast cell responses by a LAT-organized plasma membrane-localized signaling complex. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;124(1-3):137-41.
165. Gupta N, DeFranco AL. Lipid rafts and B cell signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18(5):616-26.

166. Gupta N, DeFranco AL. Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol Biol Cell*. 2003;14(2):432-44.
167. Cherukuri A, Shoham T, Sohn HW, Levy S, Brooks S, Carter R, et al. The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol*. 2004;172(1):370-80.
168. Nakayama H, Nagafuku M, Suzuki A, Iwabuchi K, Inokuchi JI. The regulatory roles of glycosphingolipid-enriched lipid rafts in immune systems. *FEBS Lett*. 2018;592(23):3921-42.
169. Jury EC, Flores-Borja F, Kabouridis PS. Lipid rafts in T cell signalling and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(5):608-15.
170. Zhu Y, Gumlaw N, Karman J, Zhao H, Zhang J, Jiang JL, et al. Lowering glycosphingolipid levels in CD4+ T cells attenuates T cell receptor signaling, cytokine production, and differentiation to the Th17 lineage. *J Biol Chem*. 2011;286(17):14787-94.
171. Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL, Ley SC. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2000;30(3):954-63.
172. Parolini I, Topa S, Sorice M, Pace A, Ceddia P, Montesoro E, et al. Phorbol ester-induced disruption of the CD4-Lck complex occurs within a detergent-resistant microdomain of the plasma membrane. Involvement of the translocation of activated protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*. 1999;274(20):14176-87.
173. Levin ER. Membrane estrogen receptors signal to determine transcription factor function. *Steroids*. 2018;132:1-4.
174. Márquez DC, Chen HW, Curran EM, Welshons WV, Pietras RJ. Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;246(1-2):91-100.
175. Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, et al. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res*. 2000;87(11):E44-52.
176. Reineri S, Bertoni A, Sanna E, Baldassarri S, Sarasso C, Zanfa M, et al. Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(2):273-8.
177. Marin R, Diaz M. Estrogen Interactions With Lipid Rafts Related to Neuroprotection. Impact of Brain Ageing and Menopause. *Front Neurosci*. 2018;12:128.

178. Marin R, Marrero-Alonso J, Fernandez C, Cury D, Diaz M. Estrogen receptors in lipid raft signalling complexes for neuroprotection. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4(4):1420-33.
179. Marin R, Ramírez C, Morales A, González M, Alonso R, Díaz M. Modulation of Abeta-induced neurotoxicity by estrogen receptor alpha and other associated proteins in lipid rafts. *Steroids*. 2008;73(9-10):992-6.
180. Schneider AE, Kárpáti E, Schuszter K, Tóth EA, Kiss E, Kulcsár M, et al. A dynamic network of estrogen receptors in murine lymphocytes: fine-tuning the immune response. *J Leukoc Biol*. 2014;96(5):857-72.
181. Maselli A, Pierdominici M, Vitale C, Ortona E. Membrane lipid rafts and estrogenic signalling: a functional role in the modulation of cell homeostasis. *Apoptosis*. 2015;20(5):671-8.
182. Rider V, Li X, Peterson G, Dawson J, Kimler BF, Abdou NI. Differential expression of estrogen receptors in women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2006;33(6):1093-101.
183. Kovats S. Estrogen receptors regulate an inflammatory pathway of dendritic cell differentiation: mechanisms and implications for immunity. *Horm Behav*. 2012;62(3):254-62.
184. Lambert KC, Curran EM, Judy BM, Lubahn DB, Estes DM. Estrogen receptor-alpha deficiency promotes increased TNF-alpha secretion and bacterial killing by murine macrophages in response to microbial stimuli in vitro. *J Leukoc Biol*. 2004;75(6):1166-72.
185. Paharkova-Vatchkova V, Maldonado R, Kovats S. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c+ CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol*. 2004;172(3):1426-36.
186. Gourdy P, Araujo LM, Zhu R, Garmy-Susini B, Diem S, Laurell H, et al. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells. *Blood*. 2005;105(6):2415-20.
187. Zou MZ, Kong WC, Cai H, Xing MT, Yu ZX, Chen X, et al. Activation of natural killer T cells contributes to Th1 bias in the murine liver after 14 d of ethinylestradiol exposure. *World J Gastroenterol*. 2022;28(26):3150-63.
188. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):626-38.
189. Dunn SE, Perry WA, Klein SL. Mechanisms and consequences of sex differences in immune responses. *Nat Rev Nephrol*. 2024;20(1):37-55.
190. Michalek RD, Gerriets VA, Nichols AG, Inoue M, Kazmin D, Chang CY, et al. Estrogen-related receptor- α is a metabolic regulator of

- effector T-cell activation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(45):18348-53.
191. Khan D, Ansar Ahmed S. The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2015;6:635.
 192. Costeira R, Lee KA, Murray B, Christiansen C, Castillo-Fernandez J, Ni Lochlainn M, et al. Estrogen and COVID-19 symptoms: Associations in women from the COVID Symptom Study. *PLoS One*. 2021;16(9):e0257051.
 193. Seeland U, Coluzzi F, Simmaco M, Mura C, Bourne PE, Heiland M, et al. Evidence for treatment with estradiol for women with SARS-CoV-2 infection. *BMC Med*. 2020;18(1):369.
 194. Sund M, Fonseca-Rodríguez O, Josefsson A, Welen K, Fors Connolly AM. Association between pharmaceutical modulation of oestrogen in postmenopausal women in Sweden and death due to COVID-19: a cohort study. *BMJ Open*. 2022;12(2):e053032.
 195. Dambha-Miller H, Hinton W, Wilcox CR, Joy M, Feher M, de Lusignan S. Mortality in COVID-19 among women on hormone replacement therapy: a retrospective cohort study. *Fam Pract*. 2022;39(6):1049-55.

© [2025] [Maria Teresa Pagano]
Il presente documento è distribuito secondo la licenza Tutti i diritti riservati.