



Università degli Studi dell'Insubria
Corso di Dottorato di ricerca in
Farmacologia Clinica e Sperimentale

Coordinatore: Dr.ssa Franca Marino

**Caratterizzazione del trasportatore vescicolare
di tipo 2 nei linfociti umani**

Tesi di Dottorato
della Dr.ssa Sriti Elisabeth De Bernardi
Matricola n. 710637

Docente Guida: Prof. Marco Cosentino

Anno Accademico 2011/2012

INDICE

1	INTRODUZIONE	4
1.1	<i>Le catecolamine come modulatori della risposta immunitaria.....</i>	<i>5</i>
1.2	<i>Network tra sistema nervoso centrale e sistema immunitario a livello degli organi linfoidi.....</i>	<i>7</i>
1.3	<i>Catecolamine endogene nelle cellule del sistema immunitario</i>	<i>10</i>
1.4	<i>Sintesi e metabolismo delle catecolamine</i>	<i>12</i>
1.5	<i>Immagazzinamento intracellulare delle catecolamine: trasportatori vescicolari delle monoamine</i>	<i>15</i>
1.6	<i>Aspetti funzionali.....</i>	<i>21</i>
1.7	<i>I linfociti T CD4⁺ e CD8⁺</i>	<i>24</i>
1.8	<i>I linfociti T regolatori.....</i>	<i>26</i>
1.9	<i>Meccanismi di inibizione indotti dalle Treg.....</i>	<i>29</i>
1.10	<i>Regolazione funzionale delle Tregolatorie</i>	<i>31</i>
1.11	<i>Ruolo delle CA in patologie degenerative e autoimmuni.....</i>	<i>33</i>
2	PREMESSE E SCOPI	43
3	MATERIALI E METODI.....	47
3.1	<i>Sostanze utilizzate</i>	<i>48</i>
3.2	<i>Separazione e purificazione delle cellule PBMC.....</i>	<i>48</i>
3.3	<i>Separazione e purificazione immunomagnetica delle cellule T CD4⁺.....</i>	<i>49</i>
3.4	<i>Separazione e purificazione immunomagnetica delle cellule T CD8⁺.....</i>	<i>50</i>
3.5	<i>Separazione e purificazione immunomagnetica delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg.....</i>	<i>50</i>
3.6	<i>Colture cellulari.....</i>	<i>52</i>
3.7	<i>Isolamento dell'mRNA totale</i>	<i>52</i>
3.8	<i>Analisi mediante Real Time-PCR dell'mRNA di VMAT1 e VMAT2</i>	<i>53</i>

3.9	<i>Valutazione citofluorimetrica della % di positività delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ a VMAT2</i>	54
3.10	<i>Adesione delle PBMC a vetrini polilisinati</i>	56
3.11	<i>Immunocitochimica</i>	56
3.12	<i>Identificazione e dosaggio delle CA mediante HPLC-ED</i>	56
3.13	<i>Analisi statistica dei dati</i>	58
4	RISULTATI	59
4.1	<i>Espressione genica di VMAT1 e VMAT2 nelle PBMC umane</i>	60
4.2	<i>Espressione genica di VMAT2 nelle sottopopolazione linfocitarie CD4⁺ e CD8⁺</i>	62
4.3	<i>Espressione proteica di VMAT2 nella sottopopolazione linfocitaria CD4⁺</i>	63
4.4	<i>Espressione proteica di VMAT2 endogeno nella sottopopolazione linfocitaria CD8⁺</i>	65
4.5	<i>Esperimenti di immunofluorescenza e analisi al confocale</i>	66
4.6	<i>Effetti della ionomicina, interferon beta (IFN-β) e tumor necrosis factor alpha (TNF-α) sul rilascio delle CA nelle PBMC umane</i>	68
4.7	<i>Effetti dell'interferon beta (IFN-β) sul rilascio delle CA nella sottopopolazione linfocitaria CD4⁺</i>	70
5	DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	72
6	BIBLIOGRAFIA	79

1 INTRODUZIONE

1.1 Le catecolamine come modulatori della risposta immunitaria

Le catecolamine (CA) sono neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP) e ormoni prodotti da cellule neuroendocrine e hanno distinti ruoli funzionali all'interno delle rispettive zone di innervazione fondamentali nel controllo di funzioni vegetative, motorie e psichiche (Trendelenburg e Weiner, 1988). Le CA furono identificate per la prima volta nel sistema nervoso autonomo (SNA). Nel 1921 Cannon individuò una sostanza chiamata "simpatina" che veniva rilasciata dalle terminazioni simpatiche in seguito a stimolazione. Successivamente tale sostanza fu identificata come noradrenalina (NA) da von Euler (1946) e fu trovata anche a livello cerebrale (Holtz, et al., 1950) sebbene la sua presenza inizialmente si pensava essere associata solo alle fibre nervose autonome che innervano la muscolatura liscia dei vasi sanguigni cerebrali. Nel 1954 Vogt rilevò il ruolo della NA come neurotrasmettitore con l'importante scoperta che la distribuzione di NA a livello cerebrale non è correlata alla distribuzione dei vasi sanguigni.

La principale CA è la dopamina (DA) da cui originano, attraverso biotrasformazioni, la NA e l'adrenalina (A). Le CA svolgono le proprie funzioni fisiologiche legandosi ai recettori dopaminergici e adrenergici presenti sulla membrana delle cellule bersaglio. In particolare, la DA può agire su cinque tipi di recettori dopaminergici, denominati D1-D5. Essi appartengono alla famiglia dei recettori costituiti da sette domini transmembrana e accoppiati alle proteine G e sono stati classificati in due sottogruppi sulla base della struttura genomica e delle proprietà farmacologiche. D1 e D5 fanno parte del gruppo D1-like e interagiscono con le proteine G di tipo $G_{\alpha s}$ che promuovono la formazione di adenosina monofosfato ciclico (cAMP) a livello intracellulare, mentre D2, D3 e D4, costituiscono il gruppo D2-like associato alle proteine di tipo $G_{\alpha i}$ che inibiscono la formazione di cAMP intracellulare.

Sia NA ed A agiscono su una categoria distinta di recettori, gli adrenocettori. Essi appartengono alla famiglia dei recettori con sette domini transmembrana accoppiati alle proteine G e sono classificati in alfa-1 e -2, e beta-1, -2 e -3. Il sottotipo recettoriale alfa-1 si associa con le proteine G di classe $G_{q/11}$ stimolando

la formazione di inositol-1,4,5-trisfosfato/diacilglicerolo (IP3/DAG) intracellulare, l'alfa-2 interagisce con le proteine G di classe $G_{i/o}$ modulando i livelli intracellulari di cAMP. Tutti i sottotipi beta-adrenergici si associano alle proteine G di tipo G_s promuovendo la formazione di cAMP intracellulare.

Le CA derivano principalmente dalle cellule cromaffini della midollare del surrene e dai neuroni presinaptici, dove vengono sintetizzate, immagazzinate e rilasciate all'esterno. Recentemente studi in vivo e in vitro hanno osservato che i linfociti umani possono sintetizzare e rilasciare le CA, implicate poi nella regolazione delle funzioni di queste stesse cellule o di altre.

A livello del SNC, la DA e NA sono rilasciate da distinti sistemi neuronali e svolgono un ruolo importante nel controllo delle funzioni vegetative, motorie, psichiche e di controllo dell'attività del SNC stesso. I maggiori circuiti che utilizzano la DA come neurotrasmettitore sono le proiezioni che connettono la sostanza nera al neostriato e quelle che connettono l'area tegmentale ventrale alle strutture limbiche, in particolare alla corteccia limbica. Neuroni contenenti DA sono anche presenti nell'ipotalamo tubero-basale ventrale dove svolgono un ruolo importante nella regolazione delle funzioni ipotalamo ipofisarie. Altri neuroni contenenti DA sono sparsi in varie regioni del SNC tra cui la retina, il bulbo olfattivo e l'ipotalamo preentricolare.

La maggior parte dei neuroni contenenti NA è, invece, organizzata prevalentemente in due sistemi assonali: nel locus coeruleus e nell'area tegmentale ventrale della formazione reticolare bulbo-pontina. Gli assoni delle cellule del locus coeruleus, dopo aver lasciato il nucleo, si distribuiscono a ventaglio per innervare praticamente ogni regione del SNC: la corteccia cerebrale, il talamo e l'ipotalamo, il bulbo olfattivo, il cervelletto, il mesencefalo e il midollo spinale. Le cellule del locus coeruleus sono coinvolte sostanzialmente nella regolazione dell'attenzione, della vigilanza e nel ciclo sonno-veglia. Sembra, inoltre, che tali cellule giochino un ruolo importante nei processi di apprendimento e di memoria, nella regolazione di meccanismi di ansia e dolore, del tono dell'umore e, più generalmente, nel metabolismo cerebrale. Poiché la NA può rendere i neuroni della corteccia cerebrale più responsivi agli stimoli sensoriali rilevanti, si suppone che il locus coeruleus abbia la funzione fondamentale di aumentare la responsività

cerebrale allo scopo di velocizzare e rendere più efficienti i processi di elaborazione dell'informazione che avvengono attraverso i sistemi punto-a-punto sensoriali e motori. Per quanto concerne il sistema tegmentale laterale, sono state identificate tre principali popolazioni neuronali: il nucleo motorio dorsale del vago, il nucleo del tratto solitario (che riceve afferenze dai centri più rostrali del sistema vegetativo e dai centri della formazione reticolare bulbo-pontina, ed esplica un controllo tonico e fasico sui neuroni pregangliari del midollo spinale e della catena laterale del simpatico) e il nucleo tegmentale laterale (da cui origina la via ascendente ventrale che innerva ipotalamo, bulbo olfattorio e parte dell'amigdala). Tali sistemi noradrenergici risultano coinvolti nel controllo dell'attività del sistema nervoso vegetativo (ad es., pressione arteriosa), nella regolazione dello stato di veglia e del comportamento alimentare, nella modulazione del sistema endocrino, oltre che nella patogenesi di taluni disturbi psichici (depressione, disturbi d'ansia). Inoltre, nel SNP, la NA rappresenta il neurotrasmettitore classico dei neuroni postgangliari del sistema simpatico, che, ad esempio, determina una vasocostrizione a livello splanchnico.

1.2 Network tra sistema nervoso centrale e sistema immunitario a livello degli organi linfoidi

I sistemi nervoso, endocrino e immunitario sono i principali sistemi adattativi del corpo e "comunicano tra loro" al fine di mantenere l'omeostasi. I sistemi implicati in questo cross-talk sono l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e il sistema nervoso autonomo (SNA) di cui fanno parte: il sistema nervoso simpatico adrenergico, il sistema nervoso parasimpatico vago-mediato e il sistema nervoso enterico (Bellinger et al., 1992; Friedman e Irwin, 1997; Elenkov et al., 2000; Kohm e Sanders, 2000). Le CA rappresentano i principali mediatori in questo network. Infatti, negli ultimi 20 anni è stato dimostrato che la NA si comporta sia come neurotrasmettitore sia come neuromodulatore negli organi linfoidi. Sotto stimolazione, la NA è rilasciata dalle terminazioni nervose simpatiche in questi organi per poi legarsi ai recettori adrenergici espressi sulle cellule immunitarie bersaglio. Il rilascio locale di NA o le CA circolanti, mediante la stimolazione di

questi recettori, influenzano la circolazione, la proliferazione, la funzionalità dei linfociti, e la produzione di citochine.

L'interazione presente fra il sistema nervoso ed immunitario mediata dalle CA è di natura bidirezionale a dimostrazione di come questi due sistemi interagiscano fra loro per mantenere condizioni di omeostasi (Fig. 1.2.1) (Qiu et al., 1996; Basu e Dasgupta, 2000; Elenkov et al, 2000).

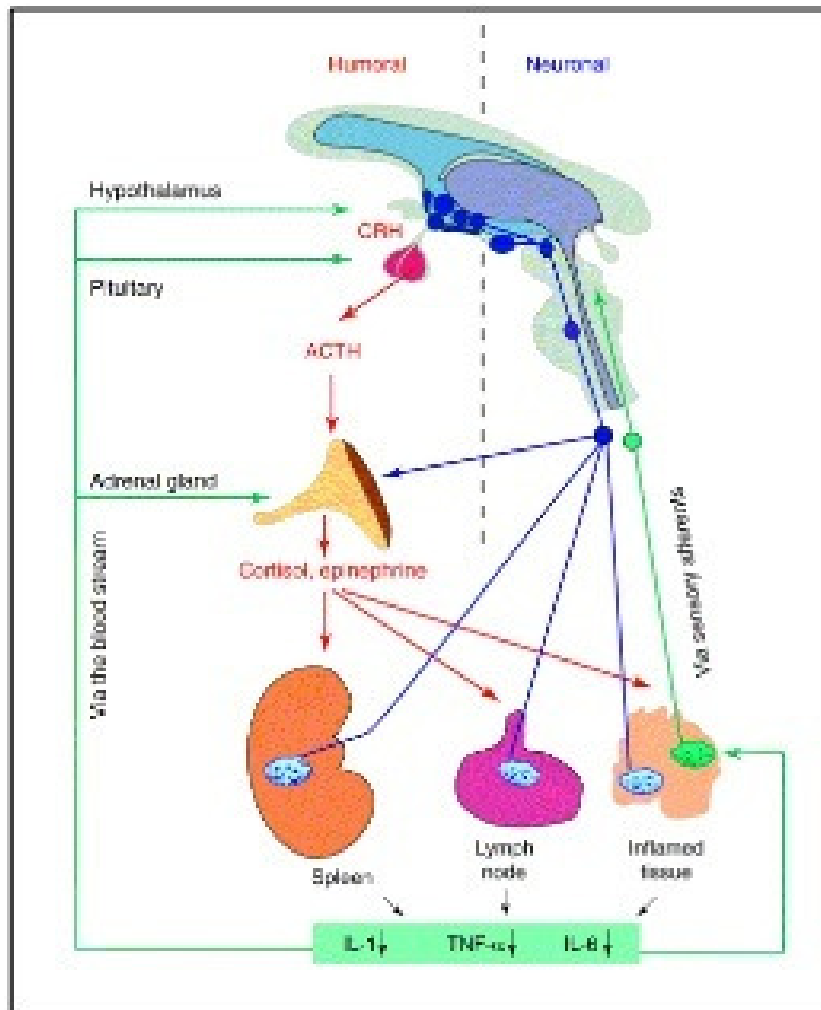


Figura 1.2.1 Rappresentazione schematica dei principali meccanismi neuroendocrini (in rosso) e nervosi (in blu) coinvolti nella modulazione nervosa della risposta immunitaria (modificata da Straub *et al.*, 1998).

Il sistema nervoso interagisce con le diverse cellule effettrici del sistema immunitario (SI), mediante la comunicazione diretta delle fibre dei nervi simpatici

che innervano i linfonodi primari e secondari (Straub RH., 2004), modulando in questo modo la proliferazione e differenziazione dei linfociti nel topo (Swanson et al., 2001) e la produzione di cellule T helper nel ratto (Sanders et al., 1997) e nelle cellule mononucleari derivate da sangue umano periferico (PBMC) (Torres et al., 2005). Le cellule del sistema immunitario sono in grado di modulare la funzione dei terminali nervosi direttamente mediante recettori presinaptici o attraverso il legame a recettori espressi su fibre nervose afferenti degli organi linfoidei, per cui il segnale proveniente dalle cellule immunitarie, sottoforma di citochine, è in grado di raggiungere il SNC.

Come è stato osservato in differenti studi queste interazioni sono facilitate dai recettori adrenergici espressi sui linfociti murini, sulle natural killer dei ratti, sui macrofagi e neutrofili dei roditori e sulle PBMC umane (per le PBMC cfr. Marino et al., 1999). Nello specifico in queste ultime cellule si è caratterizzato il ruolo delle CA utilizzando la tecnica di cromatografia liquida ad alta prestazione (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) che ha evidenziato l'esistenza di vie enzimatiche responsabili della sintesi e della degradazione delle monoamine d'interesse. Risultati importanti hanno confermato, inoltre, che le PBMC immagazzinano le CA che poi sono in grado di rilasciare nell'ambiente extracellulare e ricaptare eventualmente. La presenza dei recettori catecolaminergici giustifica l'ipotesi che esista in tali cellule un meccanismo autocrino/paracrino regolatorio.

In questo modo, le cellule del sistema immunitario regolano le loro attività e funzioni attraverso le CA endogene utilizzando due meccanismi: le CA rilasciate agiscono come mediatori autocrini e paracrini attraverso i diversi recettori (adrenergici e dopaminergici) all'interno delle cellule del sistema immunitario e nei confronti delle cellule nervose oppure le CA prodotte dai neuroni e dalla midollare del surrene attivano e modulano direttamente le funzioni intracellulari delle cellule immunitarie.

Le CA oltre a svolgere i diversi ruoli fisiologici e partecipare alla regolazione delle risposte immunitarie ed infiammatorie, sono anche coinvolte in patologie neurodegenerative e sindromi neuropsichiatriche.

Ad esempio il sistema immunitario è coinvolto nella patogenesi di malattie autoimmuni quali la sclerosi multipla e l'artrite reumatoide (Cosentino et al., 2002b; Bellinger et al., 1992) e in malattie neoplastiche come la leucemia linfatica cronica (Kamp et al., 1997). La DA è, inoltre, rilevante in patologie neurologiche quali il Morbo di Parkinson e la schizofrenia che, rispettivamente con un ipo ed iperattività del sistema dopaminergico, sono correlate con alterazioni a livello del sistema immunitario (Temlett, 1996, Birtwistle et al., 1998).

1.3 Catecolamine endogene nelle cellule del sistema immunitario

Vie biosintetiche e di degradazione classiche, attraverso le quali le cellule producono le CA, sono state caratterizzate nelle cellule mononucleate del sangue periferico umano (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC), nelle sottopopolazioni linfocitarie altamente purificate e nelle linee cellulari ematopoietiche (Bergquist et al., 1994; Basu, et al., 1999; Marino et al., 1999; Cosentino et al., 2002a).

La presenza intracellulare della tirosina idrossilasi (TH), enzima limitante nella sintesi delle CA, e della dopamina β idrossilasi (DBH), enzima che converte la DA a NA, e la modulazione della loro espressione lascia intendere la capacità di queste cellule di sintetizzare le CA *ex novo*. Studi su linfociti di ratto (Qiu YH et al., 2005) e su PBMC umane (Cosentino et al., 2002a) dimostrano che tali cellule contengono mRNA inducibile per queste idrossilasi. Inoltre, nelle PBMC umane l'enzima TH sembra essere regolato da meccanismi calcio-dipendenti (Marino et al., 1999). Fra le evidenze farmacologiche a favore della sintesi delle CA nelle cellule del sistema immunitario vi è l'azione dell' α -metil-*p*-tirosina (α -MT) che è stata studiata in PBMC umane (Musso NR et al., 1996; Marino et al., 1999; Cosentino et al., 2000). α -MT è un inibitore della TH e induce un decremento dei livelli intracellulari di CA e di alcuni dei loro metaboliti. La sintesi endogena delle CA nelle PBMC umane può modificare sotto stimolazione ad esempio da parte del mitogeno policlonale fitoemagglutinina (PHA). Essa induce l'espressione dell'mRNA della TH e conseguentemente a ciò, attraverso l'attivazione della proteina chinasi C e il contributo di meccanismi intracellulari calcio-dipendenti, si ha un aumento del quantitativo di CA all'interno della cellula di circa 20-40 volte

a 48 ore rimanendo poi a livelli elevati, mentre quelle extracellulari rimangono entro valori basali, osservati nelle PBMC non stimolate (Cosentino et al., 2002a).

Il trattamento dei linfociti umani con PHA porta anche ad altre modificazioni estremamente rilevanti del sistema catecolaminergico intrinseco a queste cellule. L'incubazione con il mitogeno PHA induce infatti l'espressione di recettori adrenergici di tipo α_1 (Roupe van der Voort et al., 2000), i quali non risultano rilevabili in PBMC umane non stimolate (Casale e Kaliner, 1984), ed incrementa la densità dei β -adrenocettori (Zoukos *et al.*, 1994).

Altre evidenze di tipo morfologico confermano un'attiva sintesi delle CA nelle cellule immunitarie. La localizzazione della TH nelle PBMC a riposo risulta essere diffusa nel citoplasma mentre nelle PBMC stimolate l'enzima è localizzato in granuli densi presenti nel citoplasma in prossimità della membrana plasmatica. Sulla base di queste osservazioni si è ipotizzato che questo enzima possa esistere in diversi stati funzionali in relazione alla localizzazione ultrastrutturale e portare quindi ad una minore o maggiore sintesi di CA (Reguzzoni et al., 2002).

E' stato visto, inoltre, che nelle PBMC le CA, e in particolare la dopamina, possono indurre apoptosi e possono essere coinvolte nella modulazione funzionale del processo apoptotico stesso, attraverso un meccanismo regolatorio autocrino e paracrino. L'inibizione farmacologica della TH nelle PBMC in coltura stimolate con PHA riduce la percentuale di cellule apoptotiche e ciò porta a ritenere che le CA endogene abbiano una funzione modulatoria nei confronti delle cellule linfocitarie (Bergquist et al., 1994; Cioca et al., 2000; Jimenez Del Rio et al., 2000; Cosentino et al., 2002b; Cosentino et al., 2003). Più recentemente, gli interferoni (IFN) sono stati identificati come molecole regolatrici della sintesi delle CA nelle PBMC umane (Cosentino et al. 2005). Quando le PBMC vengono stimolate con PHA, la produzione e il rilascio di CA vengono incrementate da IFN- β , se invece vengono stimolate con IFN- γ riducono persino l'espressione di mRNA della TH. Gli IFN sembrano essere la prima componente fisiologica capace di modulare la produzione di CA da parte delle PBMC. Sono presenti poi altri studi condotti nello specifico su cellule del sistema immunitario, quali macrofagi e neutrofili. Tali cellule quando stimolate possono generare e rilasciare CA *ex novo*, e con un meccanismo autocrino e paracrino, attraverso specifici

recettori, regolano il rilascio di mediatori verso lo spazio extracellulare (Flierl et al., 2007).

1.4 Sintesi e metabolismo delle catecolamine

Le CA fanno parte delle monoamine e derivano dall'aminoacido tirosina. Contengono nella propria struttura sia un gruppo amminico che un orto-diidrossibenzeno, il cui nome chimico è catecolo. La sintesi delle CA ha inizio con il trasporto attivo dell'amminoacido aromatico L-Tirosina nelle cellule del sistema nervoso, endocrino ed immunitario. Non è un aminoacido essenziale e viene prodotto anche dal fegato attraverso la fenilalanina idrossilasi.

L'enzima chiave nella sintesi delle CA è la tirosina idrossilasi (TH), definito enzima limitante della via biosintetica. L'azione della TH governa la formazione di tutte le CA e queste controllano l'attività dell'enzima stesso con un meccanismo inibitorio, inoltre, la regolazione avviene attraverso siti di fosforilazione controllati dalle proteine chinasi.

Il processo avviene in diversi passaggi: la tirosina viene idrossilata in 3,4-diidrossifenilalanina (L-DOPA) dall'enzima TH. Il secondo passaggio consiste nella decarbossilazione della L-DOPA, catalizzata dall'enzima DOPA-decarbossilasi che porta alla formazione di DA. La DA prodotta viene trasportata in vescicole di deposito, all'interno delle quali l'enzima dopamina β -idrossilasi (DBH) inserisce un gruppo ossidrilico in configurazione assoluta R sull'atomo di carbonio β rispetto al gruppo amminico, ottenendo così la NA.

A livello delle vescicole l'enzima feniletanolamina-N-metiltransferasi (PNMT) catalizza la conversione della NA in A attraverso N-metilazione (Fig. 1.4.1).

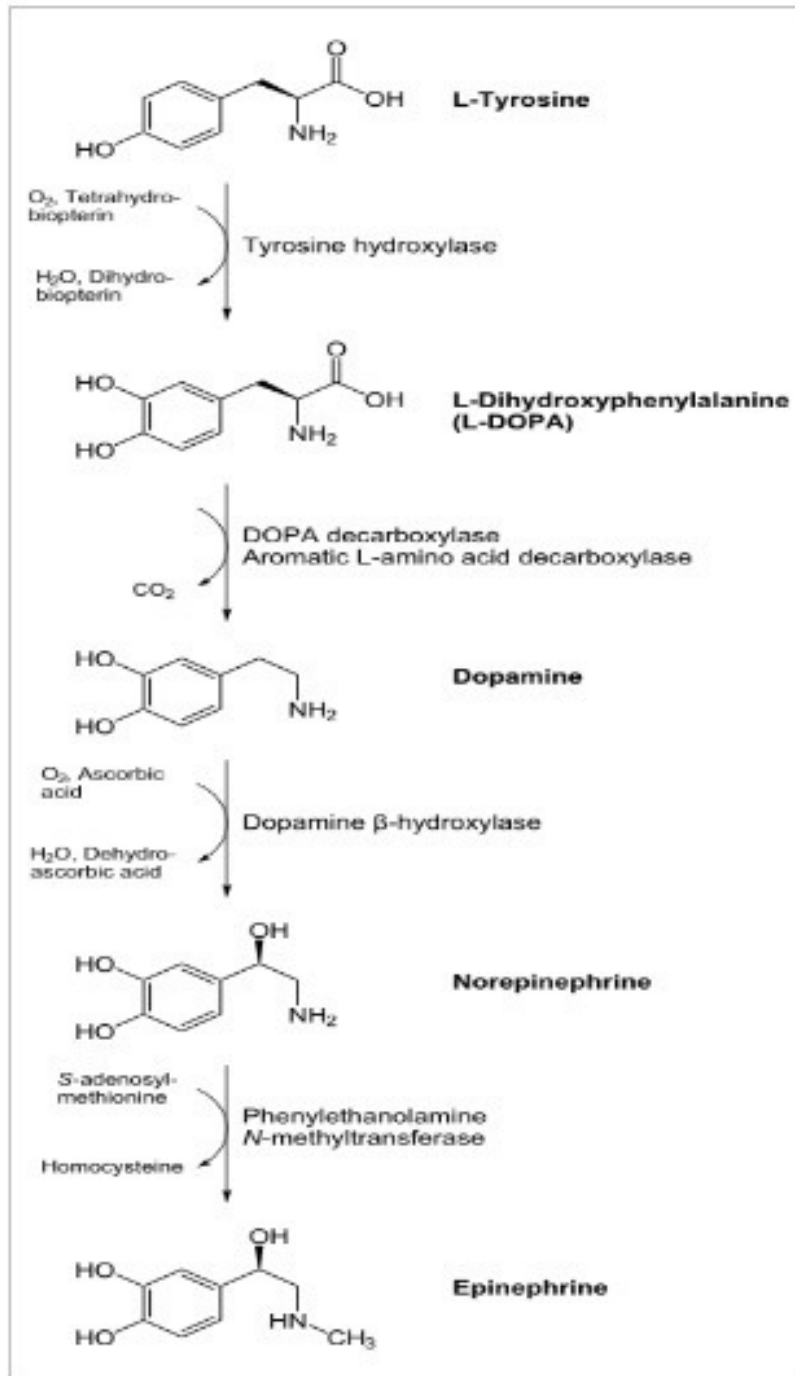


Figura 1.4.1. Sintesi dei trasmettitori catecolaminergici (Feldman, 1984)

Come nei neuroni e nelle cellule cromaffini anche nelle cellule immunitarie le CA presenti all'interno della cellula possono essere degradate da enzimi o venire immagazzinate. Le principali vie di degradazione delle CA sono rappresentate dalla deaminazione ossidativa, operata dalle monoamino ossidasi (MAO) (Bond *et*

al., 1997), e dalla o-metilazione, ad opera delle catecolmetiltransferasi (COMT) (Bidart *et al.*, 1981; 1983; Sladek-Chelgren *et al.*, 1981).

Le MAO, localizzate all'interno della cellula, addossate ai mitocondri, si dividono in due sottoclassi: isoforme A e B. L'isoforma A è adibita alla deaminazione ossidativa della NA, dell'A e della serotonina, mentre l'isoforma B metabolizza soprattutto la DA. Le MAO utilizzano come cofattore la flavina adenina dinucleotide (FAD), la reazione richiede la presenza di H₂O e O₂ e porta alla formazione di un'aldeide, originata dall'ammina primaria con liberazione di NH₃ e H₂O₂. Le COMT, localizzate prevalentemente a livello postsinaptico, negli epatociti e in tessuti quali cuore ed epidermide, si presentano in forma solubile o legate alla membrana e agiscono metilando uno dei due ossidrili catecolici avendo come risultato la formazione di metaboliti, i quali vengono poi deaminati nel fegato dalle MAO. Nello specifico le COMT sono enzimi Mg²⁺-dipendenti, che catalizzano il trasferimento di un gruppo metile dalla S-adenosinmetionina (SAM) al gruppo idrossilico localizzato in posizione 3 di molti composti catecolici (Fig. 1.4.2).

Sono stati condotti studi sulle PBMC umane in cui si è visto che il trattamento di tali cellule con pargilina, inibitore delle MAO, porta ad un aumento intracellulare di DA, NA ed A il che suggerisce l'effettiva presenza in queste cellule di un sistema catabolico per le CA (Marino *et al.*, 1999).

Durante l'inattivazione, le CA vengono degradate in vari prodotti che includono specie reattive dell'ossigeno e altri metaboliti citotossici che inducono l'apoptosi cellulare nei linfociti murini, nelle PBMC umane e nelle linee cellulari PC12 (Cosentino *et al.* 2004).

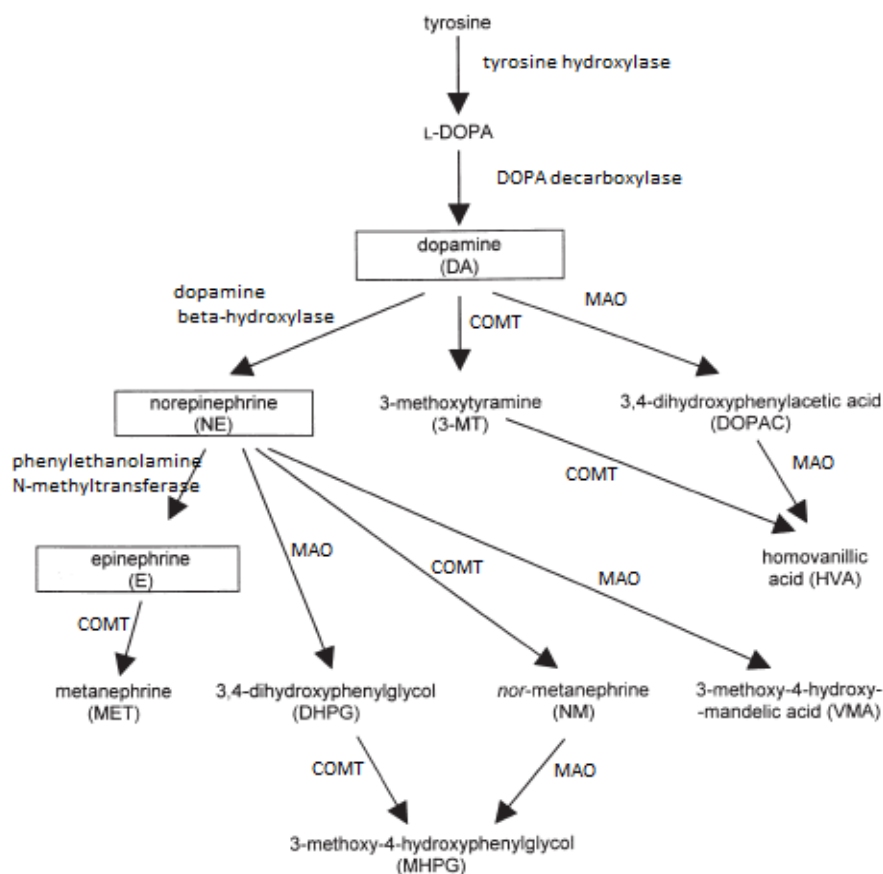


Figura 1.4.2. Schema del catabolismo di DA, NA e A e loro principali metaboliti. Gli enzimi monoamino ossidasi (MAO) che operano una deaminazione ossidativa e le catecol-O-metil transferasi (COMT) che O-metilano, intervengono nella degradazione delle CA producendo metaboliti inattivi fisiologici (Marino et al 1999).

1.5 Immagazzinamento intracellulare delle catecolamine: trasportatori vescicolari delle monoamine

Nel sistema nervoso ed endocrino esistono diverse famiglie di trasportatori vescicolari che immagazzinano i vari neurotrasmettitori fisiologici.

Nei linfociti umani, a livello intracellulare, le CA sia esogene che endogene che non vengono degradate sono immagazzinate, con un meccanismo ancora in gran parte sconosciuto, in comparti intracellulari mediante trasportatori vescicolari.

I trasportatori hanno una specifica struttura e caratteristiche biofisiche che determinano l'affinità per un determinato substrato e l'energia per la traslocazione dello stesso. Le monoamine come la serotonina, l'A, la NA e la DA sono

immagazzinate da proteine conosciute come trasportatori vescicolari delle monoamine (Vesicular MonoAmine Transporters, VMATs), che fanno parte della grande famiglia delle proteine trasportatrici di soluti (solute carrier SLC).

Il sistema di immagazzinamento delle CA è stato a lungo studiato nei neuroni simpatici e nelle cellule cromaffini della midollare del surrene. Esperimenti di clonaggio hanno identificato lo stesso trasportatore vescicolare nel ratto e nell'uomo a livello delle cellule noradrenergiche, dopaminergiche e serotoninergiche del cervello. E' stato osservato che, dopo la sintesi, le CA vengono immagazzinate in granuli o vescicole che contengono anche nucleotidi, acido ascorbico, ioni Ca^{2+} , cromogranine, peptidi e l'enzima DBH. Tale passaggio delle CA dal citoplasma ai granuli secretori avviene proprio attraverso il trasportatore vescicolare di membrana.

Per diversi decenni, i granuli cromaffini provenienti dalla midollare del surrene di bovino sono stati utilizzati come sistemi modello e hanno permesso di comprendere il funzionamento e l'eventuale possibilità di modulazione di VMAT. La prima descrizione è stata data da Kirshner (1962) e nel 1974 Phillips dimostrò che il sistema di trasporto era una proprietà della membrana dei granuli cromaffini e gli studi proseguirono su questa linea. Si scoprì che tale sistema di trasporto era accoppiato ad una proteina filogeneticamente antica conosciuta come *V-type ATPase*, la quale comportava l'acidificazione dei compartimenti sfruttando l'idrolisi di ATP per traslocare protoni nei compartimenti endocitici. Inoltre, *V-type ATPase* ha un'alta omologia con l'ATPasi batterica F_0F_1 e fu, dunque, constatato che antibiotici come la bafilomicina possono inibire la traslocazione di protoni operata da tale proteina. Nel caso di VMAT diversi enzimi glicolitici sono presenti sulle vescicole stesse per fornire energia. Questi enzimi come la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi e la fosfoglicerato mutasi, possono usare prodotti glicolitici per generare localmente ATP. Il risultante gradiente protonico attraverso la membrana vescicolare è stimato essere da 2 a 2.4 unità di pH sotto il pH neutro (7.4) del citosol. Tale condizione è favorevole all'accumulo di substrati all'interno della vescicola da parte del trasportatore. Nel caso di VMAT due protoni sono scambiati per molecola di monoamina con un sistema di antiporto monoamina/ H^+ (Fig. 1.5.1).

Anche i canali del cloro determinano il caricamento delle monoamine nelle vescicole coordinando il flusso di cloro con l'acidificazione. Questo ha la funzione di mantenere il bilancio delle cariche attraverso la membrana, ma ci sono evidenze che supportano il fatto che il cloruro stesso moduli la funzione della *V-type ATPase*.

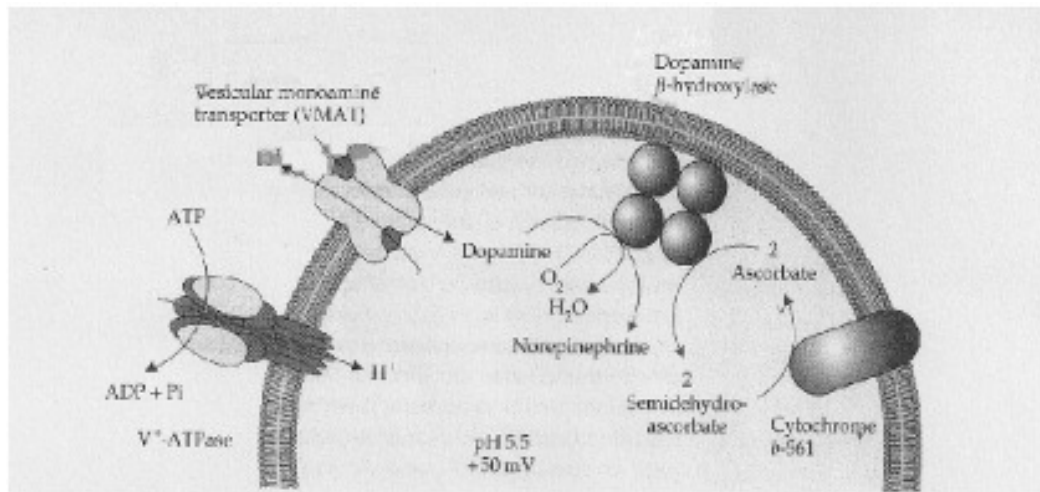


Figura 1.5.1. Trasporto della DA all'interno dei granuli cromaffini e sua biotrasformazione in NE. Le membrane dei granuli cromaffini possiedono un'ATPasi che trasloca i protoni (ioni H⁺) all'interno del granulo. Questo processo acidifica il granulo (pH di circa 5.5) e crea, inoltre, un potenziale elettrico transmembrana di circa 50mV. Il trasportatore VMAT utilizza tale gradiente elettrochimico per concentrare le CA all'interno del granulo. VMAT funziona come antiporto di protoni che trasporta nel citosol al fine di introdurre una molecola di CA all'interno. Nel granulo la DA è idrossilata a NE da un meccanismo descritto precedentemente (Feldman, 1984).

Per le CA il gradiente ionico che si instaura viene utilizzato dalla proteina trasportatrice per introdurre la DA all'interno del granulo. Nel momento in cui le cellule ricevono l'opportuno segnale funzionale, il rilascio delle CA avviene attraverso un meccanismo di esocitosi Ca²⁺-dipendente. A livello cerebrale è stato osservato che il numero di molecole trasmettitorie rilasciate quando una vescicola si fonde con la membrana plasmatica è regolato da VMAT2 e inoltre, si è visto che l'overespressione mediata da virus del trasportatore in una linea cellulare catecolaminergica quadruplica la quantità di CA rilasciate (Pothos et al., 2000). Essendo, dunque, VMAT2 responsabile dell'immagazzinamento della DA, viene

definito come il maggior regolatore della sensibilità dei recettori della DA. L'inibizione del trasportatore vescicolare della DA comporta un decremento della DA sinaptica, aumenta così la sensibilità postsinaptica a favore degli agonisti e ciò va ad alterare i pattern di espressione genica nelle cellule postsinapiche. Dunque, alterazioni nell'immagazzinamento della DA o di altre monoamine nelle vescicole sinaptiche può avere profonde ripercussioni a livello fisiologico (Henry e al., 1998).

L'organizzazione strutturale di VMAT, stabilita con analisi di idrofobicità effettuata dapprima sulle sequenze di ratto del trasportatore e in seguito sull'uomo, ha rilevato 12 domini transmembrana, con l'estremità N e C-terminale nel citosol. Il modello presenta il sito di glicosidazione nel loop tra il primo e secondo segmento transmembrana e le regioni più variabili sono a livello dell'estremità N e C-terminale e del loop glicosilato (Fig.1.5.2).

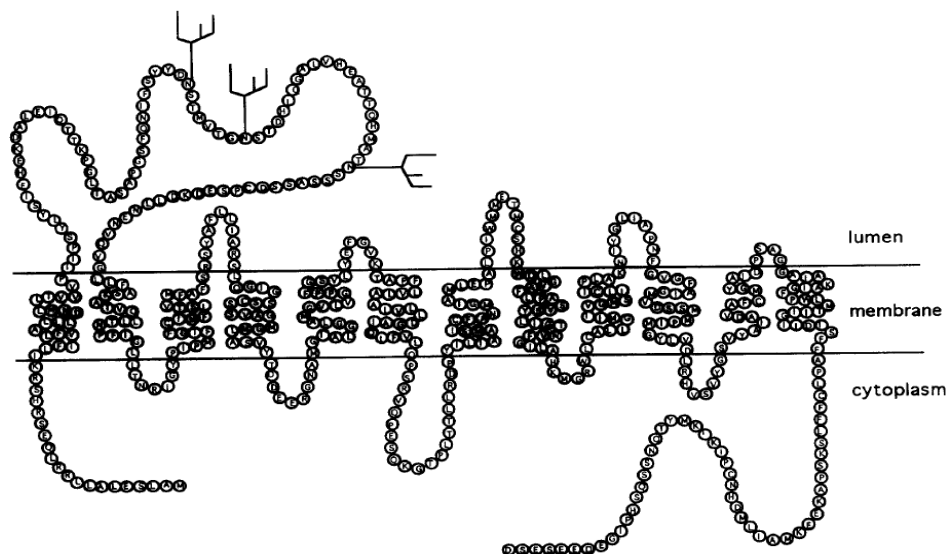


Figura 1.5.2 Sequenza di VMAT2 bovino. La sequenza aminoacidica mostra il modello topologico corrente, con 12 segmenti transmembrana. Le estremità N-terminale e il C-terminale sono presenti nel citoplasma e un largo loop intravesicolare porta 3 siti putativi di glicosidazione. La sequenza dei 518 aminoacidi è stata registrata con numero di accesso X76380 in GenBank (Henry et al., 1998).

Studi condotti negli anni '90 sui ratti e sui bovini hanno rilevato l'esistenza di due isoforme della proteina trasportatrice: VMAT1 (SLC18A1) e VMAT2 (SLC18A2) con identità di circa il 62%. A livello genico VMAT1 è stato localizzato sul cromosoma 8 (8p21.3), mentre VMAT2 sul cromosoma 10 (10q25). Inoltre, è stato visto che VMAT2 ha 3-5 fold maggiormente affini per le monoamine rispetto a VMAT1.

Le due isoforme di VMAT sono diversamente espresse nel sistema monoaminergico, studi anatomici hanno stabilito che la distribuzione delle isoforme di VMAT non è correlata con la distribuzione delle diverse monoamine. L'isoforma 1 è risultata essere prevalentemente presente nelle cellule endocrine e paracrine degli organi periferici e serve per l'immagazzinamento non solo di NA e A, ma anche di serotonina nelle cellule che sintetizzano melatonina della ghiandola pineale, mentre VMAT2 è stato identificato oltre che nei neuroni del cervello e simpatici anche in cellule contenenti istamina dello stomaco, della midollare del surrene e delle cellule del sangue. (Henry et al., 1998; Masson et al., 1999).

Sono stati identificati tre composti come principali inibitori di VMAT a livello delle vescicole neuronali e dei granuli cromaffini: reserpina, tetrabenazina e ketanserina. Questi composti che si legano a siti specifici, quando marcati radioattivamente, possono essere usati come sonde per visualizzare la localizzazione delle vescicole di trasporto e studiarne il meccanismo di funzionamento.

Oltre al compito di introdurre i neurotrasmettitori nelle vescicole sinaptiche per la funzione di neurotrasmissione, è un'evidenza crescente che VMAT2 fornisce neuroprotezione sia da sostanze tossiche endogene che esogene. I neurotrasmettitori per la loro struttura chimica possono autoossidarsi e dare stress ossidativo alla cellula se permangono in ambiente citosolico, VMAT fa fronte a ciò traslocando tali sostanze all'interno delle vescicole prima che diventino tossiche.

Tale trasportatore è utile per diversi aspetti, anche dal punto di vista clinico, ad esempio, è studiato per determinare la relazione tra vescicole piccole e grandi, per la comprensione del meccanismo di farmaci e tossine come 1-metil-4-fenilperidinio (MPP+), tetrabenazine o anfetamine, e come un marcatore nello sviluppo del cervello, inoltre, è anche un importante bersaglio per analisi di brain imaging. Sembra che VMAT2 sia stato adattato dagli eucarioti per la trasmissione sinaptica e che sia derivato da proteine filogeneticamente antiche che originariamente si sono evolute con lo scopo di proteggere la cellula (Guillot et al., 2009).

Nel sistema immunitario, studi effettuati da Marino (1999), hanno valutato la presenza del sistema di immagazzinamento e rilascio delle CA nelle PBMC umane utilizzando la reserpina, inibitore di VMAT. Essa si lega ai siti di legame sulla vescicola della cellula immunitaria, oltre che, come osservato in precedenza, ai trasportatori di granuli cromaffini, bloccando l'accumulo delle CA e la loro eventuale metabolizzazione da parte di enzimi intracellulari come la monoamino ossidasi (MAO). Ciò è stato confermato rilevando una diminuzione di DA e NA a livello intracellulare e un aumento di NA nel medium. In seguito, a livello di cellule linfocitarie fresche, attraverso microscopia confocale, la proteina di VMAT1 è stata localizzata nel citoplasma, mentre quella di VMAT2 è stata

individuata sia a livello citoplasmatico, in aree simili a vescicole, che in misura minore sulla membrana plasmatica. I dati a riguardo restano comunque molto frammentari (Amenta et al., 2001).

L'altro trasportatore delle monoamine analizzato è stato quello a livello della membrana plasmatica: il trasportatore di DA (Dopamine Transporter, DAT). Il DAT linfocitario caratterizzato è presente anche nel sistema neuroendocrino e ha probabilmente rilevanza funzionale. Tale trasportatore, infatti, viene inibito da composti conosciuti (es. GBR 12909, benzotropina e mazindolo) che, quindi, possono influenzare il trasporto di DA nel momento in cui è reintrodotta dai linfociti. Analisi condotte con la desipramina, inibitore del meccanismo di riassorbimento delle CA, hanno indicato un aumento di DA e NA a livello extracellulare, individuando la presenza di tale meccanismo in queste cellule (Marino et al., 1999).

1.6 Aspetti funzionali

La sintesi *ex novo*, il rilascio di CA endogene da parte delle cellule del sistema immunitario e l'espressione di recettori adrenergici e dopaminergici su tali cellule suggerisce che le CA potrebbero non agire solo come trasmettitori dal sistema neuroendocrino a quello immune ma essere coinvolte anche in meccanismi regolatori di tipo autocrino/paracrino fra cellule immunocompetenti.

Ad oggi, l'immunomodulazione delle CA endogene dei linfociti appare complesso e poco conosciuto e potrebbe dipendere da vari fattori quali, per esempio la concentrazione del neurotrasmettitore, il tipo e la densità dei recettori attivati, la presenza di altri neurotrasmettitori o di citochine nel microambiente della cellula immunitaria, lo stato di differenziazione e di attivazione cellulare ed il tempo di interazione fra le CA ed i propri recettori (Bellinger *et al.*, 1992; Elenkov *et al.*, 2000).

La prima descrizione degli aspetti funzionali delle CA documentata in letteratura risale nel 1904 (Loeper M et al.) e descrive un'importante leucocitosi dopo somministrazione sottocutanea di adrenalina. Tuttavia, solo verso la metà degli anni 90 è stato riportato che le CA derivate da linfociti modulano le funzioni

attraverso un meccanismo autocrino/paracrino (Bergquist *et al.*, 1994). Studi condotti su linfociti e fagociti dimostrano che l'espressione dell'mRNA degli enzimi TH e DBH è inducibile da diversi stimoli se comparati con i rispettivi controlli non stimolati. Questi studi sottolineano che la sintesi delle CA nelle cellule esaminate dipende dallo loro stato funzionale, e che esistono differenti cellule bersaglio. (Flier MA *et al.*, 2007; Brown SW *et al.*, 2003).

Tsao (1998) ha osservato che l'aloiperidolo, antagonista dei recettori dopaminergici, inibisce la proliferazione delle cellule linfoidi di ratto. Studi su ibridomi con α -metil-*p*-tirosina (α -MT) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP), inibitori dell'enzima TH, hanno evidenziato una riduzione sia dell'espressione di TH sia della proliferazione cellulare in maniera concentrazione dipendente, suggerendo che l'espressione di TH potrebbe essere correlata alla crescita delle cellule del sistema immunitario.

Al contrario, studi condotti da Qui (2005) mostrano che l' α -MT, inibitore dell'enzima TH, stimola la proliferazione linfocitaria indotta dalla concanavalina A (Con A), mentre la pargilina, inibitore delle monoaminoossidasi, sopprime la proliferazione linfocitaria indotta da Con A, aumentando i livelli intracellulari di cAMP rispetto ai relativi controlli. L'azione inibitoria della pargilina è revertita parzialmente con la fentolamina, antagonista dei recettori adrenergici di tipo α , e totalmente con il propanolo, antagonista β -adrenergico, suggerendo che i recettori α - e β - adrenergici mediano la modulazione della funzione linfocitaria indotta dalle CA e che l'effetto dei recettori β -adrenergici è maggiore rispetto a quello degli α . α -MT e pargilina, inoltre, influenzano il contenuto delle CA a livello intra- ed extra-cellulare: il primo riduce il contenuto di CA sia nelle cellule che nel medium, mentre il secondo ne induce un aumento, mostrando la loro azione inibitoria rispettivamente a livello di sintesi e degradazione delle CA nei linfociti.

Splenger (1994) ha evidenziato l'esistenza di un meccanismo noradrenergico autocrino che interviene nella regolazione della produzione di TNF- α nei macrofagi murini. Nello specifico, ha osservato che gli agonisti α -adrenergici inducono un aumento della secrezione del TNF- α , mentre gli agonisti β -adrenergici la riducono.

Diversi studi suggeriscono che le CA sarebbero in grado di modulare la capacità migratoria delle cellule natural killer (Schedlowsky et al., 1996) e di indurre l'espressione delle cellule immunitarie di alcune proteine coinvolte nell'apoptosi (Josefsson et al., 1996; Basu e Dasgupta, 2000). Inoltre, si è osservato che l'inibizione della produzione endogena di CA a seguito di stimolazione cellulare nei linfociti umani si associa ad una riduzione dell'apoptosi (Cosentino et al., 2002b).

Studi in vitro condotti su linfociti T umani mostrano che il neurotrasmettitore DA, a concentrazioni fisiologiche, blocca la proliferazione cellulare mediante inibizione dell'enzima TH (Ghosh et al., 2003; Cosentino et al., 2007) e la citotossicità delle sottopopolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+ attraverso i recettori D1/D5, D2 e D3. Da questi lavori si deduce il ruolo della DA nella regolazione delle funzioni dei linfociti T (Saha et al., 2001; Kipnis et al., 2004). Inoltre, l'esposizione di PBMC umane alla NA determina un profilo distintivo nella produzione di citochine da parte delle popolazioni linfocitarie, aumentando la sintesi di citochine di tipo Th1 (IL-2) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (Torres KC et al., 2005). Pertanto sembra probabile che le CA attivino, in modo selettivo, differenti sottopopolazioni determinando un particolare profilo di espressione dei mediatori pro- e anti-infiammatori.

Queste scoperte inducono a ritenere che la rete delle citochine/chemochine infiammatorie possa essere uno dei più importanti sistemi di comunicazione, strettamente controllato dalle CA attraverso i relativi recettori.

E' evidente che le CA non agiscano solo come neurotrasmettitori dal sistema nervoso a quello immune ma che possano essere coinvolte in meccanismi regolatori di tipo paracrino/autocrino fra cellule immunocompetenti (Cosentino et al., 2002), contribuendo alla regolazione dell'ematopoiesi, alla modulazione della risposta immunitaria, alla proliferazione, alla differenziazione e alla migrazione delle cellule immunitarie all'interno degli stessi organi linfoidei (Elenkov, 2000; Maestroni, 2000).

Le CA sono anche coinvolte in patologie autoimmuni o infiammatorie quali la sclerosi multipla e l'artrite reumatoide (Bellinger et al., 1992; Zoukos et al., 1994;

Chelmicka-Schorr e Arnason, 1994, 1999; Baerwald et al., 1997; Miller et al., 2000).

1.7 I linfociti T CD4⁺ e CD8⁺

I linfociti T sono responsabili della risposta immunitaria cellulo-mediata. Essi originano dal midollo osseo, maturano nel timo ed entrano nel circolo sanguigno come T naive. La struttura più importante presente sulle superfici dei linfociti T è il recettore per l'antigene (T Cell Receptor, TCR). Tale recettore, di struttura complessa, è un eterodimero formato da una catena α e una β (α/β TCR) oppure da una catena γ e una δ (γ/δ TCR) entrambe associate a una serie di peptidi co-recettori come il CD3, responsabile della trasmissione dei segnali all'interno della cellula, oppure il CD4⁺ o CD8⁺ a seconda che i linfociti T siano "helper" o "citotossici". Il TCR riconosce esclusivamente frammenti peptidici degli antigeni proteici precedentemente processati da cellule specializzate nel presentare l'antigene (Antigen Presenting Cells, APC) e poi esposti legati a una molecola del complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC). Una volta che l'antigene presente nelle APC si lega al TCR questo si attiva e inizia a secernere diverse proteine regolatrici chiamate citochine, le quali mediano l'infiammazione e la risposta immunitaria. Le principali funzioni delle citochine sono di promuovere la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T, regolare la qualità e il livello della risposta immunitaria e attivare i macrofagi e gli eosinofili.

I linfociti T si differenziano in sottopopolazioni sulla base della loro funzione e dei marcatori di membrana che presentano. I primi risultati circa l'esistenza di differenti sottopopolazioni linfocitarie T effettrici furono documentati in letteratura da Mosmann (1986). Si riconoscono due principali sottopopolazioni: i linfociti T helper CD4⁺ e i linfociti T citotossici/soppressori CD8⁺.

I linfociti T helper CD4⁺ esprimono il fenotipo CD4⁺ CD8⁻ e costituiscono circa un terzo della popolazione di cellule T mature. I linfociti T helper presentano il co-recettore CD4 associato al complesso TCR che riconosce soltanto le molecole MHC di classe II espresse sulle APC. Il compito principale dei linfociti T helper consiste di aiutare e supportare la risposta immunitaria cellulo-mediata, quindi di

amplificare la funzione di altre cellule, favorendo la produzione e la secrezione di anticorpi da parte dei linfociti B, inducendo i linfociti citotossici a differenziarsi in cellule effettrici e infine stimolando i macrofagi e altre cellule non specifiche a intervenire nelle reazioni di ipersensibilità ritardata.

I linfociti T helper $CD4^+$ possono differenziarsi in sottopopolazioni di cellule effettrici che producono citochine diverse dotate di differenti funzioni. Nello specifico, i linfociti T helper 1 (Th1) producono principalmente l'interferone-gamma ($INF-\gamma$), il quale stimola le cellule citotossiche e attiva i macrofagi, promuovendo soprattutto la risposta immunitaria cellulo-mediata. I linfociti T helper 2 (Th2) producono prevalentemente IL-4 e IL-5 che stimolano la proliferazione dei linfociti B e quindi la sintesi delle diverse classi anticorpali, promuovendo quindi la risposta immunitaria di tipo umorale. I linfociti T helper 17 (Th17) producono IL-17, che stimola il rilascio di citochine e chemochine coinvolte nel reclutamento, attivazione e migrazione dei neutrofili. L'equilibrio tra linfociti T helper tipo 1 e tipo 2 ha un ruolo fondamentale nella genesi di problematiche autoimmuni, allergiche o di ridotta efficienza antivirale del sistema immunitario. Infatti, uno sbilanciamento verso uno o l'altro polo d'attivazione potrebbe essere alla base di vari disturbi. Recenti scoperte hanno evidenziato che i soggetti con un sistema immunitario costantemente sbilanciato verso i linfociti Th1 presentano una maggiore possibilità di sviluppare malattie di tipo autoimmune (sclerosi multipla, artrite reumatoide, diabete mellito, celiachia, etc.). L'aumento di cellule Th1 determina una condizione infiammatoria cronica che distrugge i tessuti del corpo. Persone il cui sistema immunitario è squilibrato verso i linfociti Th2 possono, con maggiore probabilità, soffrire di problematiche allergiche. Anche pazienti con cancro avanzato e con malattie infettive come AIDS ed epatite B o C presentano uno sbilanciamento in favore di cellule Th2. L'aumento di cellule Th2 sopprime la possibilità di avere una risposta immunitaria efficace contro il tumore o virus. Quindi, risulta essere importante identificare approcci farmacoterapeutici innovativi per l'immunomodulazione al fine di ripristinare tale equilibrio immunologico.

I linfociti T citotossici $CD8^+$ esprimono il fenotipo $CD4^- CD8^+$ e presentano il corecettore CD8 associato al complesso TCR che riconosce le molecole MHC di

classe I espresse sulle APC. Una volta attivati in seguito al legame dell'antigene con costimolatori o linfociti Th, le cellule CD8⁺ si trasformano in linfociti T citotossici (CTL), capaci di distruggere specificatamente le cellule infette che presentano quell'antigene. Più precisamente i CTL da un lato lisano le cellule allogeniche che veicolano antigeni di istocompatibilità di classe I diversi dai propri, dall'altro distruggono le cellule sinergiche, ossia le cellule che presentano gli stessi antigeni di istocompatibilità che siano però stati modificati nella loro struttura da un virus o da una trasformazione neoplastica.

I linfociti T citotossici svolgono un importante ruolo nel controllo e nel funzionamento del sistema immunitario in quanto sono deputati a sopprimere, direttamente o attraverso fattori solubili, l'attività di altre cellule immunitarie come i linfociti B e T e macrofagi.

1.8 I linfociti T regolatori

Il primo studioso a suggerire l'esistenza di cellule con attività immunosoppressiva fu Gershon nei primi anni '70 (1972 e 1975) il quale coniò la definizione di linfociti T "suppressor". La prima evidenza funzionale deriva da esperimenti di Taguchi e Nishizuka del 1980 che mostrano come la timectomia neonatale di topi normali causa la comparsa di disordini autoimmuni nell'adulto. Studi di Sakaguchi, il quale inoculò topi *nu/nu* (privi del timo) con cellule CD4⁺ prive di una sottopopolazione che esprimeva alti livelli di CD25 (catena α del recettore di IL-2), osservano l'insorgenza di gravi disordini autoimmuni che colpiscono indistintamente vari organi in questi topi.

I linfociti T regolatori (Treg) hanno un ruolo fondamentale nel controllo dell'omeostasi immunitaria, modulando l'intensità e la durata della risposta immunitaria e inibendo la proliferazione e l'attivazione dei linfociti T helper (Th) e dei linfociti T citotossici (Tc).

Esse costituiscono il 5-10% dei linfociti T circolanti, sia nell'uomo che nei roditori. La letteratura evidenzia l'esistenza di diverse classi di cellule regolatorie che nonostante svolgano la stessa funzione modulatrice della risposta immunitaria, si differenziano per i recettori esposti a livello della membrana, la

via di differenziamento all'interno dell'organismo e il meccanismo di soppressione, che varia in base al microambiente (tessuto e citochine rilasciate in loco) nel quale esse si trovano ad operare. Possono essere classificate in due grandi categorie, in accordo con i loro marcatori di superficie e/o citochine prodotte: Treg derivanti direttamente dal timo e spontaneamente presenti in esso, dette Treg naturali (o costitutive) (natural Treg, nTreg), e Treg indotte (o adattative) in periferia (induced Treg, iTreg) (Zou et al., 2006). Le cellule nTreg si sviluppano nel timo e poi migrano negli organi periferici, mantenendo la funzione regolatoria (5). Tra le iTreg si identificano le regolatorie di tipo 1 (Tr1), le regolatorie di tipo 3 (Tr3).

Le Treg sono considerate “naturalmente anergiche” anche se esprimono il fenotipo di linfociti attivati. Alcuni studi di tipo genetico hanno mostrato come le Treg esprimano costitutivamente alcuni marcatori di attivazione quando comparati con le cellule T effettrici (Teff). Esse esprimono esclusivamente un recettore di tipo $\alpha\beta$, alti livelli dei recettori CD25, il recettore del fattore di necrosi tumorale indotto *dai glucocorticoidi* (Glucocorticoid Induced TNF Receptor, GIRT), l'*antigene 4* associato ai *linfociti T citotossici* (Cytotoxic T lymphocytes associated antigen-4, CTLA-4) e bassi livelli del *recettore della proteina tirosin-fosfatasi* (CD45RB) e la *catena alfa del recettore per IL-7* (CD127) (5).

Si ritiene che le cellule T regolatorie siano frutto di una linea differenziativa diversificata rispetto a quella che dà origine ai linfociti T CD4⁺ e T CD8⁺, guidata dall'espressione del fattore di trascrizione Foxp3.

Nell'uomo il gene codificante Foxp3 si trova sul cromosoma X e la sua mutazione è correlata ad una patologia letale del nascituro chiamata IPEX (Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy and X-linked inheritance) (Lal et al., 2009). L'IPEX, oltre ad essere caratterizzato da una considerevole proliferazione linfocitaria, che è la causa di disordini autoimmunitari in diversi organi, presenta la totale assenza delle cellule Treg. Questa osservazione ha permesso di dimostrare che Foxp3 è il fattore determinante che guida lo sviluppo di tali cellule.

Il fattore di trascrizione Foxp3 appartiene a una famiglia di fattori di trascrizione chiamati FOX, ed è costituito da diversi domini strutturali fra cui: zinc-finger, una

struttura a cerniera di leucina e, al C-terminale, un dominio a forcina con il quale si lega al DNA inibendo la trascrizione dei geni a valle. Il fattore Foxp3 è infatti un regolatore negativo della trascrizione. Diversi studi hanno mostrato come tale fattore riconosca una sequenza di DNA in prossimità di una consenso riconosciuto dal fattore NFAT che attiva la trascrizione di geni codificanti per molte citochine infiammatorie, fra le quali IL-2, IL-4 TNF α . Si ritiene che la proteina Foxp3 competa per il sito di legame al DNA con NFAT, portando all'inibizione della trascrizione delle citochine pro-infiammatorie (Fontenot et al., 2005).

Per quanto riguarda la selezione timica delle cellule Treg, si suppone che tale differenziamento, indotto dall'espressione di Foxp3, sia dovuto al grado di affinità del TCR $\alpha\beta$, espresso dalle cellule Treg, per le molecole self presentate dalle molecole MHCII espresse dalle cellule stromali del timo (Schwartz 2005). Tuttavia, nonostante tale riconoscimento sia fondamentale per il differenziamento verso un fenotipo regolatorio, diversi autori ritengono che siano coinvolte una o più molecole secrete dalle cellule epiteliali del timo come ad esempio il fattore di crescita trasformante beta (Transforming Growth Factor *beta*, TGF- β) che agirebbe come fattore costimolatorio nell'induzione dell'espressione di Foxp3. Inoltre, si mette in evidenza anche l'importanza della formazione di un microambiente citochinico all'interno dei corpuscoli di Hassal, che risulterebbe essenziale per la generazione delle cellule Treg (Ladi et al., 2006). Le cellule epiteliali di tali corpuscoli producono la citochina IL-7, detta anche *linfopoietina timica stromale* (Thimic Stromal Lymphopoietin, TLSP) che promuove l'espressione da parte delle cellule dendritiche di maggiori livelli di molecole costimolatorie come CD80/86 causando la conversione MHC-dipendente dei linfociti T CD4⁺ CD25⁻ in cellule Foxp3 CD4⁺ CD25⁺ Treg.

Rudensky e collaboratori hanno dimostrato che le cellule positive all'espressione di Foxp3 sono cellule Treg. Questi ricercatori hanno costruito una proteina di fusione Foxp3-GFP (green fluorescein protein) in modo da poter marcare e osservare, mediante la valutazione dell'emissione di fluorescenza, tutte le cellule positive per Foxp3. Con questo sistema, hanno osservato che tutte le cellule che esprimevano il complesso fluorescente Foxp3-GFP erano CD4⁺CD25⁺, ed anche

se una piccola parte di queste cellule non mostrava l'espressione del CD25, queste mantenevano ugualmente la capacità inibitoria (Fontenot et al., 2005b).

L'importanza del fattore di trascrizione Foxp3 nell'indurre il differenziamento in cellule Treg è confermato da esperimenti che evidenziano come la trasfezione retrovirale del gene Foxp3 in cellule Th CD4⁺ CD25⁻ porti queste ultime ad assumere la funzioni di cellule regolatorie.

La scoperta del gene codificante per questo fattore di trascrizione è stata di notevole importanza, in quanto è attualmente l'unico marcatore certo per l'identificazione delle cellule Treg.

1.9 Meccanismi di inibizione indotti dalle Treg

Le cellule Treg hanno un'elevata capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T effettori, helper e citotossici.

Le Treg provenienti dal timo possono esplicare la loro azione soppressiva mediante un meccanismo dipendente dal contatto cellulare oppure mediante la secrezione di citochine IL-10 e TGF- β) o mediante entrambi questi meccanismi (Song Guo Zheng *et al.*, 2004; Piccirillo e Thornton, 2004; Fehervari e Sakaguchi, 2004).

Le cellule Treg indotte di classe 1 sopprimono, *in vivo*, la proliferazione delle cellule T effetttrici mediante la produzione di IL-10, mentre quelle di tipo 3 attraverso la produzione della citochina immunosoppressoria TGF- β (Fig 1.9.1).

CD4⁺ e CD8⁺ attivati mediante la via del Granzima A e delle perforine. Un altro meccanismo di inibizione della proliferazione cellulare riguarda l'attivazione dell'enzima IDO (idoleammine 2-3 dioxigenasi). Tale enzima è coinvolto nel metabolismo del triptofano libero, amminoacido importante per la proliferazione dei linfociti T. Si suppone che il legame fra il CTLA-4 sulla membrana delle Treg e il CD80/86 esposto sulla cellula dendritica (DC), attivi l'enzima IDO a metabolizzare il triptofano libero riducendone la quantità disponibile, causando l'inibizione dell'attivazione e della proliferazione delle cellule T (Boehmer 2005). Anche il recettore per i glucocorticoidi, GITR, espresso dalle Treg circolanti ad alti livelli, svolge un importante ruolo nella regolazione dell'attività delle Treg. E' stato osservato che una stimolazione di questo recettore dopo 24 ore di co-cultura promuove la soppressione delle cellule Th CD4⁺ CD25⁻. Tuttavia, la stimolazione di GITR con un mAb specifico, blocca l'attività soppressoria delle Treg (Sakaguchi et al., 2004).

Le cellule Treg sono coinvolte in patologie immunologiche, immunità tumorale, e tolleranza nei trapianti (Piccirillo e Thornton, 2004).

E' noto infatti che un ridotto numero o una ridotta funzionalità delle varie classi di cellule regolatorie portano all'insorgenza di tali disordini; così come un sovrannumero di tali cellule è in grado di inibire le risposte protettive ai microorganismi patogeni e alle formazioni neoplastiche.

1.10 Regolazione funzionale delle Tregolatorie

Il numero, il fenotipo, la migrazione e la funzionalità delle cellule Treg dipendono da stimoli specifici presenti in periferia. Le citochine, ad esempio, sono un gruppo eterogeneo di proteine secrete che hanno un ruolo cruciale nella regolazione di tutti gli aspetti funzionali del sistema immunitario, come la differenziazione cellulare, l'omeostasi, la tolleranza, l'immunità e lo sviluppo della memoria immunologica. Oltre alle citochine esistono molecole non proteiche, come gli steroidi, lipidi, sfingolipidi e metaboliti della vitamina A e D, che sono in grado di influenzare la differenziazione, la migrazione e funzionalità delle cellule T (Campbell e Koch, 2011)

E' stato osservato che i fattori, come la molecola costimolatrice CD28, TGF- β , cellule dendritiche e le citochine IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15, sono in grado di modulare la l'attività soppressoria delle Treg attraverso il trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 5 (Signal transducer and activator of transcription 5, STAT5). L'alterata funzionalità può dipendere anche da una inadeguata espressione delle molecole di superficie implicate nella soppressione contatto-dipendente, quali CTLA4, CD39, *gene 3 di attivazione linfocitaria* (Lymphocyte-activation gene 3, LAG3), granzima A e FAS (Buckner, 2010). Inoltre, la composizione dell'ambiente locale, incluso i tipi di APC e citochine come TNF (Korn, et al., 2007; Valencia et al., 2006), IL-4, IL-6, IL-12, IL-7, IL-15 e IL-21, possono influenzare la funzione delle cellule Treg (Buckner, 2010). Contemporaneamente, sono stati proposti diversi meccanismi con cui le cellule T effettrici potrebbero resistere all'azione soppressiva delle Treg. Ad esempio, in presenza delle cellule Treg, le citochine IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 stimolano la proliferazione delle cellule T effettrici, inibendone l'azione soppressorie (Yates, et al., 2007). Anche diversi membri della famiglia del recettore del TNF sono implicati in tale processo: l'assenza di espressione della molecola OX40 compromette l'attività delle Treg (Takeda, et al. 2004) così come il legame di 4-1BB induce resistenza alle cellule T effettrici verso l'azione soppressoria delle Treg (Buckner, 2010).

Gli interferoni (INF) modulano l'omeostasi e la funzionalità delle Treg. Diversi studi indicano che INF- β è in grado di ripristinare il numero e l'azione soppressoria delle Treg in pazienti affetti da sclerosi multipla. Al contrario, l'INF- α e γ ne inibiscono la loro proliferazione (Cosentino et al., 2005; Zaffaroni et al., 2005).

Recenti studi hanno mostrato che i metaboliti delle vitamine A e D sono in grado di influenzare lo sviluppo e l'omeostasi delle Treg rispettivamente a livello intestinale e cutaneo (Campbell e Koch, 2011). L'acido retinoico induce l'espressione dei recettori homing intestinali, integrina $\alpha 4\beta 7$ e recettore per le chemochine CCR9, favorendo la differenziazione a livello periferico delle Treg indotte e contribuendo a mantenere il numero delle Treg durante le risposte infiammatorie. La vitamina D ha simili effetti a livello cutaneo. La vitamina D3,

prodotta dalle cellule dendritiche cutanee, induce l'espressione di CCR10, recettore delle chemochine implicato nella localizzazione delle cellule T a livello epidermico. Questi dati suggeriscono che i segnali anatomici guidati da metaboliti possono guidare la migrazione e le proprietà funzionali delle Treg necessarie per l'immunoregolazione nei tessuti di interesse.

Alcuni lavori hanno identificato la DA come un diretto modulatore della risposta immunitaria (Basu e Desgupta, 2000) e negli ultimi anni ne è stata individuata la capacità di modulare la funzionalità dei linfociti, in particolare di inibire la funzionalità delle Treg (Cosentino et al., 2007).

Infatti, studi di neurodegenerazione sul topo hanno permesso di individuare la DA come unico nerotrasmettitore capace di indurre effetti neuroprotettivi attraverso una diminuzione dell'attività soppressiva delle Treg così come delle loro proprietà adesive e migratorie, attraverso meccanismi recettori dopaminergici (D₁ e D₅)-dipendenti e ERK-dipendenti (Kipnis et al., 2004).

1.11 Ruolo delle CA in patologie degenerative e autoimmuni

Il sistema nervoso autonomo/simpatico e l'asse HPA influenzano l'autoimmunità in modo complesso, in particolare possono modulare l'equilibrio tra i linfociti T (Arnason et al., 1988; Chrousos, 1995; Wilder, 1995; Rogers and Fozdar, 1996). L'equilibrio tra tali linfociti ha un ruolo fondamentale nella genesi di problematiche autoimmuni, allergiche o di ridotta efficienza antivirale del sistema immunitario. Infatti, uno sbilanciamento verso uno o l'altro polo d'attivazione potrebbe essere alla base di vari disturbi. Diversi studi testimoniano che le malattie autoimmuni sono caratterizzati da alterazioni a livello dello bilanciamento tra Th1 e Th2. Ad esempio la sclerosi multipla (SM), l'artrite reumatoide (AR), il diabete mellito di tipo 1 (DMT1), la malattia autoimmune della tiroide (ATD) e la malattia di Crohn presentano uno sbilanciamento verso Th1 con produzione eccessiva di IL-12 e TNF- α (Wilder, 1995; Mosmann and Sad, 1996). La proliferazione e la differenziazione dei Th1, correlata ad una risposta immunitaria cellulo-mediata, sembrano essere un fattore critico in queste malattie (Segal et al., 1998). D'altra parte, il lupus eritematoso sistemico (LES) è

associato ad uno sbilanciamento verso Th2 e una produzione eccessiva di IL-10 (Maini et al., 1994; Horwitz et al., 1998).

Recenti scoperte hanno infatti evidenziato che i soggetti che hanno un sistema immunitario costantemente sbilanciato verso i linfociti Th1 hanno una maggiore possibilità di sviluppare malattie di tipo autoimmune (sclerosi multipla, artrite reumatoide, diabete mellito, celiachia, etc.). L'aumento delle cellule Th1 determina una condizione infiammatoria cronica che distrugge i tessuti del corpo. Persone il cui sistema immunitario è squilibrato verso i linfociti Th2 possono, con maggiore probabilità, soffrire di problematiche allergiche. Anche pazienti con cancro avanzato o con malattie infettive come AIDS, epatite B o C presentano uno sbilanciamento in favore delle cellule Th2. L'aumento delle cellule Th2 sopprime la possibilità di avere una risposta immune efficace contro il tumore o virus.

Evidenze ampiamente documentate riportano il coinvolgimento delle cellule Treg nelle malattie autoimmuni. Infatti, tali cellule contribuiscono al mantenimento della tolleranza periferica per cui alterazioni a livello di numero, proliferazione, migrazione e funzionalità causano l'insorgenza di malattie. Il ruolo delle cellule Treg nel mantenimento della tolleranza verso il self è stato mostrato in topi privi di cellule Treg nei quali è stata indotta una malattia autoimmune, tra cui la sclerosi multipla, l'artrite reumatoide (Sakaguchi et al., 1995; Suri-Payer et al., 1998). Da allora, le cellule Treg sono state ampiamente studiate al fine di individuare terapie mirate.

Inoltre sono presenti numerosi studi che descrivono il coinvolgimento di meccanismi autocrini/paracrini catecolaminergici in patologie autoimmuni, infiammatorie, quali la SM e l'AR (Bellinger et al., 1992, Zoukos et al., 1994), neurodegenerative (come il Morbo di Parkinson), psichiatriche (quali schizofrenia e depressione) ed in patologie complesse causate da alterazioni a livello della trasmissione catecolaminergica.

Risulta essere importante identificare approcci farmacoterapeutici innovativi per l'immunomodulazione al fine di ripristinare tale equilibrio immunologico.

1.11.1 Sclerosi multipla

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica demielinizzante, a patogenesi autoimmune, che colpisce il SNC. È una patologia multifattoriale, l'insorgenza è data dall'associazione di una suscettibilità di tipo genetico a fattori ambientali. Ha un'insorgenza giovanile, colpisce prevalentemente in età compresa fra i 20-40 anni, con un apice intorno ai 28-30 anni. Le donne risultano essere colpite più frequentemente degli uomini in un rapporto di 2:1 (McFarlin et al., 1982). L'incidenza varia in base alle aree geografiche e si assesta intorno a 1-80 casi ogni 100.000. Il Canada, gli Stati Uniti del nord e l'Europa settentrionale sono le aree dove la patologia si manifesta con maggior frequenza. La SM è caratterizzata da una degenerazione della mielina e delle guaine assonali con conseguente alterazione della velocità di trasmissione degli impulsi nervosi. Studi condotti su modello animale della SM, l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), supportano che la patologia sarebbe secondaria ad una risposta autoimmune rivolta verso gli antigeni self. Tale modello evidenzia che il processo autoimmune demielinizzante nel SNC sia rappresentato dall'attivazione nel sangue periferico di cellule T specifiche per gli antigeni mielinici. Le cellule linfocitarie attivate sono in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica, di interagire con le cellule presentanti l'antigene site nell'ambito del SNC, di produrre citochine pro-infiammatorie che a loro volta promuovono l'attivazione di popolazioni citotossiche, dando origine ad uno stato infiammatorio che sfocia in lesioni a carico delle guaine mieliniche e conseguente danno assonale. Nello specifico, dopo il riconoscimento dell'antigene, inizia la sintesi di IL-12 che favorisce la produzione di IFN- γ e TNF- α . Tale reazione infiammatoria può autolimitarsi grazie alla produzione di citochine anti-infiammatorie, determinando la regressione della sua espressione e della sintomatologia clinica entro alcune settimane. Nel caso in cui tale processo infiammatorio non riesca ad autolimitarsi, si verifica l'attivazione di ulteriori cellule, per lo più macrofagi, che danno inizio al processo di demielinizzazione tipico della SM che può determinare un danno che va dalla distruzione della guaina mielinica alla degenerazione assonale. Il danno tissutale è determinato da molteplici meccanismi immunologici appartenenti sia alla risposta adattativa che a quella innata.

Sebbene alla base dello sviluppo della SM vi siano meccanismi immunologici complessi, il ruolo principale della patogenesi di questa malattia viene attribuito ai linfociti CD4⁺. Studi condotti su modello animale murino confermano tale affermazione: l'EAE è una patologia che può essere trasferita attraverso l'inoculazione di linfociti CD4 mielino-specifici riattivati in vitro.

I linfociti CD4⁺ naive sottoposti a stimoli specifici danno origine a differenti sottopopolazioni linfocitarie: Th1, Th2 e Th17 secernenti rispettivamente INF- γ , IL-4 e IL-17. Esistono molteplici evidenze che dimostrano il ruolo ricoperto dalle cellule Th1 nella patogenesi della SM. Dati clinici indicano un peggioramento del quadro clinico in pazienti trattati con IFN- β e l'aumento dei livelli circolanti di tale citochina nelle fasi acute della malattia (Beck et al., 1988) suggerendo un ruolo negativo di questa citochina nella SM (Hohnoki et al., 1998). Inoltre si è osservato che nella SM gli attacchi sono preceduti da una aumentata produzione di IFN- β sia dalle cellule del fluido cerebrospinale che da linfociti di sangue periferico (Olsson et al., 1990; Rieckmann et al., 1994; Hohnoki et al., 1998). Livelli elevati di IL-17 sono stati riscontrati sia nel liquor sia nelle lesioni dei pazienti affetti da SM. Inoltre, la somministrazione di Ab anti-IL1-7 previene l'induzione di EAE nel topo (Langrish et al, 2005; Lock et al, 2002).

Di fatto, però, le popolazioni cellulari coinvolte nel processo infiammatorio alla base della malattia sono molteplici. Studi recenti hanno suggerito la possibilità che anche i linfociti CD8 citotossici siano coinvolti nello sviluppo della SM. Nel modello murino dell'encefalomielite demielinizzante di Theiler il danno mielinico dipende da un'azione antivirale mediata dai linfociti CD8⁺, supportando come la popolazione citotossica possa indurre infiammazione a livello cerebrale, con conseguente demielinizzazione e danno assonale. L'attivazione dei linfociti CD8⁺ sarebbe mediata dall'interazione con neuroni e cellule gliali che esprimono molecole MHC di classe I, il che le farebbe divenire target preferenziali di questa sottopopolazione linfocitaria (Junker et al., 2007; Neumann et al., 2002).

Il farmaco maggiormente utilizzato per il trattamento della SM è l'IFN- β (Revel, 2003), la cui attività può essere riassunta in tre principali azioni a livello del sistema immunitario (Yong et al., 1998): durante il processo di attivazione dei linfociti T, durante la migrazione di queste cellule nel SNC e infine durante la

sintesi ed il rilascio di citochine proinfiammatorie, che induce complessivamente una riduzione della reattività immunitaria. Vi sono alcuni studi che suggeriscono come l'efficacia dell'IFN- β sia dovuta in parte alla sua abilità di inibire diverse azioni dell'IFN- γ (Yong et al., 1998; Revel, 2003). Sembrerebbe quindi che l'IFN- β possa essere benefico per la malattia (Revel, 2003), mentre l'IFN- γ potrebbe aggravarla (Hohnoki et al., 1998).

Evidenze cliniche indicano che una alterata funzionalità delle cellule T regolatorie (Treg) potrebbe contribuire alla alterazione della tolleranza immunitaria in pazienti affetti da SM (Viglietta et al., 2004; Venken et al., 2006). In tali pazienti la capacità intrinseca delle Treg di sopprimere la proliferazione (indotta da stimoli policlonali e/o allogenici) delle cellule T effettrici sembra essere diversa rispetto a soggetti sani (Viglietta et al., 2004; Haas et al., 2005). Inoltre si è osservato che le Treg di pazienti affetti da questa patologia hanno una ridotta espressione dell'mRNA del FoxP3 (Walker et al., 2003; Hong et al., 2005).

1.11.1.1 Catecolamine e sclerosi multipla

Dati presenti in letteratura descrivono alterazioni delle CA in pazienti affetti da SM ed un loro coinvolgimento nella patogenesi e/o progressione di questa patologia. In particolare, si osserva un aumento significativo dei livelli di A nei linfociti di sangue periferico nel primo attacco della SM, mentre quelli della NA sono significativamente più bassi durante le remissioni (Rajda et al., 2002). Studi condotti su PBMC attivate provenienti da pazienti affetti da SM cronocaprogressiva o SM a decorso remittente è stato osservato che la produzione di DA è alterata, se confrontata con controlli sani e con SM a decorso remittente (Cosentino et al., 2002a; Giorelli et al., 2005). Cambiamenti delle CA endogene potrebbero essere collegate ad alterazioni a livello dei meccanismi apoptotici, che portano alla sopravvivenza di cellule autoreattive e che si verificano durante la SM clinicamente attiva (Pender, 1998; Macchi et al., 1999; Comi et al., 2000; Sharief et al., 2002) così come ad altri aspetti della patogenesi e/o progressione di questa patologia (Bellinger et al., 1992; Chelmicka-Schorr et al., 1999). Altri studi evidenziano un possibile coinvolgimento nella SM anche di meccanismi adrenergici e dopaminergici in quanto l'espressione dei recettori catecolaminergici risulta essere aumentata in pazienti con SM (Chelmicka-Schorr e Arnason, 1994).

Studi in vitro su linfociti umani di soggetti sani mostrano che la citochina IFN- β aumenta la produzione di CA e induce la loro liberazione nello spazio extracellulare, mentre l'IFN- γ ne riduce la produzione attraverso la soppressione dell'espressione del gene della TH. Infine, esperimenti di conincubazione di queste due citochine mostra che l'IFN- β previene l'effetto inibitorio dell'IFN- γ (Cosentino et al., 2005). L'azione stimolatoria dell'IFN- β sulla produzione di CA endogene da parte di linfociti T avviene oltre che in soggetti sani anche in pazienti affetti da MS e trattati con interferoni (Zaffaroni et al., 2005). Le proprietà immunomodulanti degli INF nella SM hanno aperto nuove prospettive terapeutiche. E' stato osservato che nei linfociti di pazienti con SM trattati con INF- β per dodici mesi la produzione di CA aumenta ed è resistente all'inibizione indotta dall' INF- γ . L'espressione genica dell'enzima TH e dei recettori beta adrenergici e dopaminergici incrementa già dopo un mese e continua ad aumentare fino a sei-dodici mesi di trattamento.

Quindi, nei pazienti affetti da SM il trattamento con IFN- β aumenta la capacità da parte dei linfociti di sintetizzare le CA, e ripristina l'efficienza delle vie adrenergiche e dopaminergiche, che potrebbe comportare ad una riduzione a livello della proliferazione delle cellule T e della secrezione di IFN- β (Giorelli et al., 2005). Infatti, i recettori beta adrenergici sono stati considerati come un bersaglio promettente nella farmacoterapia della SM e, in particolare, il salbutamolo, agonista selettivo beta2, è stato proposto come terapia aggiuntiva in pazienti affetti da SM in quanto inibisce le proliferazione dei linfociti T e il rilascio di INF- β (Makhlouf et al., 2002).

La maggior comprensione dei meccanismi di regolazione dei recettori beta adrenergici nei linfociti di pazienti con SM, anche in relazione al trattamento con agenti immunomodulanti, consentirebbe ad aumentare i potenziali benefici dei farmaci che agiscono a livello dei recettori beta-adrenergici

1.11.2 Artrite Reumatoide

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica, a carattere sistemico, caratterizzata da un'intesa attivazione linfocitaria all'interno dei

compartimenti sinoviali, con conseguente erosione della cartilagine e dell'osso da parte del tessuto sinoviale infiammato.

L'esordio della malattia può avvenire a qualunque età, anche se è più frequente in soggetti di età compresa tra i 40 e i 60 anni. Le donne risultano essere colpite più frequentemente degli uomini in un rapporto di 4:1.

La genesi della malattia è multifattoriale. Esiste una predisposizione genetica allo sviluppo della malattia che causa un'alterata risposta immunitaria contro agenti ambientali (batteri, virus etc).

Studi sierologici e colture linfocitarie mostrano che il 60-70% dei pazienti di razza caucasica affetti da AR presenta gli antigeni di classe II HLA-DR4 e DR1 (Varesini, 2004).

L'interazione della predisposizione genetica con la presenza di agenti scatenanti innesca una risposta infiammatoria che si traduce con l'attivazione dei linfociti CD4+ e la produzione della citochina IL-4 che attivano i linfociti B, i monociti-macrofagi e i sinoviociti. Tali cellule concorrono nell'attivare altri gruppi di cellule e nel produrre citochine così da mantenere l'infiammazione.

I linfociti B sono i produttori del fattore reumatoide e degli anticorpi contro gli antigeni scatenanti con conseguente formazione di immunocomplessi che vanno a localizzarsi a livello della cartilagine articolare e del liquido sinoviale con conseguente infiammazione sinoviale acuta, depositandosi anche a livello dei vasi extra-articolari, come punto di partenza del danno sistemico. Le citochine prodotte dai linfociti T, monociti, macrofagi e sinoviociti stimolano invece la proliferazione sinoviale, l'infiammazione si automantiene e diventa di tipo cronico, caratterizzata dalla produzione del panno sinoviale, cioè un tessuto di granulazione destruento che invade la cartilagine ialina articolare, i tendini e l'osso subcondrale. Quindi, nell'AR si verifica una perdita di equilibrio tra le citochine pro- e anti-infiammatorie. In particolare TNF- α , IL-1 e IL-6 sono le citochine che rivestono un ruolo fondamentale nell'infiammazione di questa malattia in quanto sono in grado di alimentare e mantenere attivo il processo flogistico, determinando la distruzione del tessuto connettivale da parte delle metalloproteinasi della matrice e l'attivazione della osteoclastogenesi. Gli inibitori

del TNF- α sono tra i principali farmaci utilizzati per il trattamento dell'AR, in quanto sono in grado di innescare diversi fenomeni biologici, che vanno dalla soppressione dei livelli circolanti di IL-6, con conseguente diminuzione dei valori di proteina C reattiva, alla riduzione della cellularità e dell'infiammazione a livello della membrana sinoviale reumatoide. Inoltre, il blocco del TNF- α , comporta una riduzione dell'afflusso di linfociti sinoviali e una riduzione dose-dipendente dei livelli circolanti di metallo-proteinasi.

1.11.2.1 Catecolamine e artrite reumatoide

Evidenze sperimentali e cliniche supportano il coinvolgimento di alterate interazioni neuro-immunologiche nella patogenesi della malattia.

Diversi studi documentano un'alterazione dei recettori β 2-AR a livello delle PBMC in pazienti affetti da AR. In particolare, in questo studio hanno osservato una riduzione significativa dei β 2-RA insieme ad una diminuzione dell'attività soppressiva indotta dalle CA a livello della proliferazione linfocitaria, contribuendo alla patogenesi della malattia (Baerwald et al., 1999).

In un lavoro di Lombardi (1999) non si osserva una riduzione dei β 2-AR a livello dei linfociti di pazienti con AR, ma una diminuzione significativa dell'attività delle chinasi dei recettori accoppiati alle proteine G (GRK) di tipo 2 e 6, favorendo, in questo modo, l'azione delle citochine pro-infiammatorie. Inoltre, dopo la stimolazione dei β 2-AR si verifica un aumento significativo di cAMP e una inibizione della produzione di TNF- α . Studi in vitro su PBMC provenienti da pazienti con AR hanno evidenziato che le CA non sono in grado di stimolare la produzione di citochine con profilo Th2, perpetuando in questo modo la risposta infiammatoria (Wahle et al., 2006).

Miller (2000) ha evidenziato una alterata regolazione simpatoadrenergica della risposta immunitaria nel tessuto sinoviale, dove l'innervazione simpatica si riduce mentre aumenta quella sensoriale. Tale alterazione è correlata ad un aumento del grado dell'infiammazione. Nonostante la perdita di fibre simpatiche, si osserva una elevata quantità di NA secreta dalle cellule positive all'enzima TH, principalmente dai macrofagi sinoviali presenti nel tessuto infiammato. La quantità di NA presente è correlata con il grado di infiammazione e con la

secrezione spontanea di IL-8, mentre la densità di cellule positive a TH è correlata con la secrezione di IL-6, IL-8 e MMP-3 (Miller et al., 2002). Nei pazienti AR trattati con corticosteroidi il tessuto sinoviale presenta una riduzione di secrezione spontanea di citochine e NA, di cellule T, macrofagi e cellule positive a TH, dello stato infiammatori. Studi in vitro su sinoviti umani mostrano che la NA inibisce la sintesi di IL-8 e TNF- α , supportando che la riduzione di fibre nervose simpatiche insieme ad una bassa dose di NA in condizioni di riposo è fondamentale per lo sviluppo del processo infiammatorio (Miller et al., 2002). La NA secreta dalle cellule positive a TH nel tessuto sinoviale rappresenterebbero un meccanismo antinfiammatori. Infatti, in pazienti con AR è stato dimostrato che la secrezione sistemica, insieme alla produzione locale di NA, sono necessari per diminuire l'infiammazione sinoviale, mentre l'infusione sistemica di A potrebbe portare ad una riduzione della produzione endogena di cortisolo e di conseguenza ad una maggiore infiammazione (Straub et al., 2002).

Ulteriori prove sul ruolo critico della produzione locale di CA da parte delle cellule immunitarie nel tessuto sinoviale si hanno da Capellino (2010) che dimostra su un modello animale di AR che l'aumento del rilascio di CA inseguito all'inibizione del trasportatore vescicolare delle monoamine 2 (VMAT2) si traduce con una ampia riduzione della sintesi di TNF- α e con un miglioramento dello stato infiammatorio.

Nell'AR le cellule produttrici le CA a livello locale potrebbero quindi rappresentare un nuovo bersaglio per la terapia farmacologica eventualmente nel contesto delle strategie neuroimmunofarmacologiche volte a ripristinare l'equilibrio autonomo globale (Koopman et al., 2011).

Evidenze cliniche indicano la presenza di Treg con un'alterata funzionalità nei pazienti affetti da AR. Il principale modello utilizzato per studiare il ruolo delle Treg è l'artrite collagene-indotta nei topi DBA/1. La deplezione delle cellule Treg da un antigene anti-CD25 14 giorni prima dell'insorgenza clinica dell'artrite collagene-indotta aggrava la malattia e amplifica la risposta cellulo-mediata ed umorale (Morgan et al., 2003), mentre il trasferimento adottivo di cellule CD25+ è efficace nel trattamento della malattia (Morgan et al., 2005). Inoltre, l'assenza di

cellule Treg nei topi K/BXN causa l'isorgenza precoce e più aggressiva dell' AR (Nguyen et al., 2007).

In diversi studi sono state osservate alterazioni a livello del fenotipo e funzionalità di tali cellule nel sangue e nel liquido sinoviale.

Le cellule Treg presenti nel liquido sinoviale di pazienti AR non sono in grado di inibire la produzione di IFN- γ e TNF- α da parte delle CD4+, monociti con conseguente mantenimento della proliferazione delle cellule T effettrici (Ehrenstein et al., 2004; Cao et al., 2004). Inoltre, le cellule T effettrici del liquido sinoviale mostrano una sensibilità ridotta verso l'azione soppressione indotta dalle Treg, rispetto a quelle presenti nel sangue periferico (van Amelsfort et al., 2004). La citochina TNF- α , che è sovraespressa nell'AR, stimola l'espressione del recettore di tipo II sulle Treg, diminuendo in tal modo l'espressione di Foxp3 con conseguente alterazione della funzionalità T regolatoria (Valencia et al., 2006).

Il liquido sinoviale contiene grandi quantità di citochine pro-infiammatorie, APC e altre cellule reclutate nello stato attivato. Questo ambiente pro-infiammatorio può inibire l'attività soppressoria da parte delle cellule Treg. Ad esempio, l'over-espressione di molecole co-stimolatorie come HLA-II, CD80, CD86 e CD40 dai monociti del liquido sinoviale diminuisce gli effetti soppressivi delle Treg (van Amelsfort et al., 2007). Tra le citochine pro-infiammatorie, presenti abbondantemente nel liquido sinoviale, IL-7 può diminuire la sensibilità delle cellule T effettrici verso l'azione soppressoria delle cellule Treg. Inoltre IL-2 o la costimolazione di CD28 può revertire lo stato anergico delle cellule Treg, abolendo la loro funzionalità (Jonuleit et al., 2001).

I presenti studi supportano l'ipotesi che le cellule Treg hanno un ruolo centrale nell'AR, per cui risulta essere importante individuare trattamenti mirati che agiscano direttamente o indirettamente su tali cellule, al fine di ripristiare un equilibrio a livello del sistema infiammatorio e bloccare il processo infiammatorio.

2 PREMESSE E SCOPI

Il sistema immunitario possiede una complessa organizzazione di cellule che regolano reciprocamente lo stato funzionale attraverso interazioni mediate da fattori solubili e da contatto cellulare. Esso, insieme ai sistemi nervoso ed endocrino, costituisce il network neuroimmunologico in cui i mediatori immuni possono influenzare il sistema nervoso e i neurotrasmettitori del sistema nervoso sono in grado di modulare la risposta immunitaria (Friedman e Irwin, 1997; Elenkov et al., 2000).

Le CA hanno un ruolo molto importante sia come trasmettitori fra il sistema nervoso ed immunitario sia come mediatori autocrini/paracrini nelle cellule immuni (Basu e Dasgupta, 2000; Elenkov et al., 2000).

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno mostrato che i linfociti umani possiedono un sistema endogeno dopaminergico/adrenergico simile a quello presente nei neuroni. In particolare, hanno identificato la dopamina come un diretto modulatore della risposta immunitaria (Basu e Dasgupta, 2000) e negli ultimi anni ne è stata individuata la capacità di modulare la funzionalità dei linfociti. La dopamina inibisce la funzionalità delle cellule T regolatorie (Cosentino et al., 2007), ovvero linfociti di tipo T CD4⁺CD25⁺ che modulano le risposte immunitarie mediante una soppressione della funzionalità delle cellule T CD4⁺CD25⁻ effettrici permettendo così il controllo dell'omeostasi immunitaria e contribuendo al mantenimento della tolleranza immunologica (Sakaguchi et al., 1995).

Attualmente si ritiene che la dopamina sia l'unico trasmettitore in grado di indurre effetti neuro protettivi attraverso una diminuzione dell'attività soppressiva delle cellule Treg così come delle loro proprietà adesive e migratorie, attraverso i recettori dopaminergici.

Nel corso degli ultimi anni, numerosi studi hanno consentito di ipotizzare il coinvolgimento di meccanismi autocrini/paracrini catecolaminergici in patologie autoimmuni, infiammatorie (quali la sclerosi multipla e l'artrite reumatoide) (Bellinger et al., 1992, Zoukos et al., 1994), neurodegenerative (come il Morbo di Parkinson), psichiatriche (quali schizofrenia e depressione) ed in patologie complesse causate da alterazioni a livello della trasmissione catecolaminergica.

Alla luce di queste scoperte si ipotizza che le CA non agiscano solo come neurotrasmettitori dal sistema nervoso a quello immune ma che possano essere coinvolte perfino in meccanismi regolatori di tipo paracrino/autocrino fra cellule immunocompetenti (Cosentino et al., 2002), contribuendo alla regolazione dell'ematopoiesi, alla modulazione della risposta immunitaria, alla proliferazione, alla differenziazione, alla migrazione ed al movimento all'interno degli stessi organi linfoidei delle cellule immunitarie (Elenkov, 2000; Maestroni, 2000).

Obiettivo del mio programma di dottorato, nell'ambito della caratterizzazione del sistema catecolaminergico nei linfociti umani, è stato quello di caratterizzare il trasportatore vescicolare delle monoamine (Vesicular MonoAmine Transporter, VMAT), isoforme 1 e 2, e di investigare i processi di immagazzinamento e liberazione delle CA nelle sottopopolazioni linfocitarie CD4+, CD8+ e Treg, caratterizzandoli a livello molecolare, cellulare e farmacologico.

Una parte del lavoro è stato condotto in collaborazione con il Consorzio M.I.A. (Microscopy and Image Analysis), presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca.

Il progetto è stato ripartito nelle seguenti fasi operative:

1 – Caratterizzazione dell'espressione genica e proteica di VMAT di tipo 1 e 2 nei linfociti umani mediante real time PCR, citofluorimetria, esperimenti di immunofluorescenza e analisi al confocale di: (i) espressione di VMAT2 endogeno; (ii) colocalizzazione VMAT2-dopamina β -idrossilasi endogeni. Le analisi sono state effettuate su colture di PBMC, sottopopolazioni linfocitarie CD4+, CD8+ e T reg separate con sorting immunomagnetico.

2 – Analisi dei processi di rilascio delle CA dai linfociti umani con particolare attenzione ad una possibile modulazione da parte di diversi agenti sia fisiologici che farmacologici sulla produzione, sull'accumulo e sulla liberazione delle CA endogene mediante tecniche cromatografiche di tipo HPLC con rilevazione elettrochimica. Abbiamo valutato i livelli intra- ed extracellulari, ed il contenuto totale di CA endogene nelle PBMC umane messe in coltura per 48 h, in condizioni normali ed in seguito a stimolazione con il mitogeno PHA. Le PBMC

sono state trattate per 30 min con ionomicina (IONO), interferon-beta (INF- β) e il fattore di crescita tumorale alfa (TNF- α).

Parte dei risultati di questo studio sono stati oggetto di presentazione in occasione del XXI° Congresso Associazione Italiana Neuroimmunologia, tenutosi a Pollenzo dal 22 al 25 settembre 2011-

3 MATERIALI E METODI

3.1 Sostanze utilizzate

Ficoll-Paque Plus è stato acquistato dalla Pharmacia Biotech (Uppsala, Svezia); RPMI 1640 heat-inactivated fetal calf serum (FCS) e penicillina/streptomicina sono stati comprati da EurocloneR (Milano, Italia); fitoemoagglutinina (PHA), SCH23390, reserpina, ionomicina, interferone- β , dopamina, noradrenalina e paraformaldeide (PFA) sono stati acquistati da Sigma AldrichR (Italia); anticorpi anti-CD3 and anti-CD28 sono stati comprati da Becton Dickinson (Milano, Italia); VMAT1 (SLC18A1) and VMAT2 (SLC18A2) sono stati acquistati da Applied BiosystemsTM (USA); Dynal CD4 Isolation Positive Kit and Dynal CD8 Isolation Positive Kit sono stati comprati da Miltenyi BiotecTM (Germania); gli anticorpi anti-rabbit VMAT2, anti-DBH e donkey anti-Guinea Pig coniugato con 488 sono stati comprati dalla Immunological Sciences (Italia); donkey anti-goat coniugato con rodamina è stato acquistato da Rockland (Italia); Toto-3 iodide (642/660) è stato comprato dall'Invitrogen (Italia). Gli anticorpi anti-human CD3 in topo coniugato in Allofocianina (APC) (CD3APC), anti-human CD4 in topo coniugato in Ficoeritrina (PE) (CD4PE) e anti-human CD8 in topo coniugato con Ficoeritrina e *cianina 7* (PE-Cy7) (CD8PE-Cy7) sono stati comprati da Becton, Dickinson (Milano, Italia); il kit FIX&PERM è stato acquistato da Società Italiana Chimici (Roma, Italia); gli anticorpi IgG anti-rabbit in capra legato al fluorocromo Isotiocianato di Fluorescina (FITC), anti-human in topo CD4 coniugato in FITC e anti-human in topo CD25 legato al fluorocromo Ficoeritrina (PE) sono stati acquistati da Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA). Gli anticorpi monoclonali umani anti-CD3 e anti-CD28 sono stati acquistati da Becton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA).

3.2 Separazione e purificazione delle cellule PBMC

Le PBMC sono state ottenute da *buffy coat* di sangue venoso periferico proveniente dal Servizio di Immunoematologia dell'Ospedale di Circolo di Varese. Ogni campione di sangue è stato diluito con PBS 1:1, stratificato su Ficoll-Paque Plus e centrifugato a 400 rcf per 40 minuti (min) a 23°C. Durante la centrifugazione la differente densità ha portato alla formazione di strati contenenti

diversi tipi cellulari: sul fondo della provetta gli eritrociti, completamente aggregati grazie al Ficoll-Paque Plus, ed i granulociti che, per effetto osmotico della soluzione di Ficoll-Paque Plus, hanno raggiunto una densità sufficiente per migrare attraverso lo strato di Ficoll-Paque Plus. Per la loro bassa densità, invece, i linfociti si trovavano nell'interfaccia tra fase organica (Ficoll-Paque Plus) ed acquosa, creando una banda opalescente assieme ad altre particelle a lenta sedimentazione, quali monociti e alcune piastrine; nella fase organica sovrastante, infine, si trovava la maggior parte delle piastrine. Le PBMC, recuperate delicatamente dalla banda opalescente con una pipetta Pasteur, hanno subito un lavaggio in PBS 1X seguito da centrifugazione a 300 rcf a 23°C per 10 min. In presenza di eritrociti nel pellet, si procede alla lisi risospingendolo accuratamente con la soluzione lisante (rapporto pellet:lisante circa 1:20). Si effettua un lavaggio in PBS 1X. Al termine della centrifugazione, le PBMC sono messe in incubazione con la soluzione di Türk e poste in una camera di Bürker per la conta cellulare. Le cellule così separate sono divenute pronte per la coltura.

La sospensione di PBMC così ottenuta conteneva tipicamente circa l'80% di linfociti e il 16% di monociti.

3.3 Separazione e purificazione immunomagnetica delle cellule T CD4⁺

La separazione immunomagnetica positiva delle cellule CD4⁺ è stata fatta mediante l'utilizzo del kit *Dynal CD4 Positive Isolation* (Invitrogen, Italia). Le PBMC sono state risospese alla concentrazione di 1×10^7 cellule/ml in *buffer1* (PBS/BSA: NaCl [8,4 g/l], Na₂HPO₄ [1,42 g/l], NaH₂PO₄ [0,27 g/l], BSA [1 g/l]; EDTA 2mM [0,74 g/l]) alle quali sono state aggiunte 25 µl di biglie coniugate con un anticorpo monoclonale primario specifico per gli antigeni di membrana prevalentemente espressi sulle cellule T umane. Dopo un'incubazione di 20 min a 4°C con rotazione, la provetta è stata inserita nel separatore magnetico e il surnatante è stato eliminato poiché le cellule CD4⁺ si trovavano legate alle biglie. Per staccare le cellule CD4⁺ dalle biglie sono stati aggiunti a 1×10^7 cellule 100 µl di *buffer2* (RPMI 1640 con 1% di FBS) e 10 µl di soluzione contenente anticorpi policlonali anti-Fab specifici per l'anticorpo CD4, in grado di idrolizzare il legame biglia-cellula. Dopo un'incubazione di 45 min in rotazione a temperatura

ambiente la provetta è stata inserita nel separatore magnetico per recuperare il surnatante contenente le cellule CD4⁺, così pronte per la conta cellulare.

3.4 Separazione e purificazione immunomagnetica delle cellule T CD8⁺

La separazione immunomagnetica positiva delle cellule CD8⁺ è stata fatta mediante l'utilizzo del kit *Dynal CD4 Positive Isolation* (Invitrogen, Italia). Le PBMC sono state risospese alla concentrazione di 1x10⁷ cellule/ml in *buffer1* (PBS/BSA: NaCl [8,4 g/l], Na₂HPO₄ [1,42 g/l], NaH₂PO₄ [0,27 g/l], BSA [1 g/l]; EDTA 2mM [0,74 g/l]) alle quali sono state aggiunte 25 µl di biglie coniugate con un anticorpo monoclonale primario specifico per gli antigeni di membrana prevalentemente espressi sulle cellule T umane. Dopo un'incubazione di 20 min a 4°C con rotazione, la provetta è stata inserita nel separatore magnetico e il surnatante è stato eliminato poiché le cellule CD8⁺ si trovavano legate alle biglie. Per staccare le cellule CD8⁺ dalle biglie sono stati aggiunti a 1x10⁷ cellule 100 µl di *buffer2* (RPMI 1640 con 1% di FBS) e 10 µl di soluzione contenente anticorpi policlonali anti-Fab specifici per l'anticorpo CD8, in grado di idrolizzare il legame biglia-cellula. Dopo un'incubazione di 45 min in rotazione a temperatura ambiente la provetta è stata inserita nel separatore magnetico per recuperare il surnatante contenente le cellule CD8⁺, così pronte per la conta cellulare.

3.5 Separazione e purificazione immunomagnetica delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg

Le cellule Treg sono state purificate dalle PBMC ottenute da sangue venoso periferico di donatori sani, mediante l'utilizzo del *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit* (Miltenyi, Italy).

Il campione cellulare (PBMC) viene centrifugato a 300 g per 5 min, il pellet risospeso in 90 µl di Buffer (PBS 1X / BSA 0,5% / EDTA 2 mM) ogni 10⁷ cellule a cui vengono aggiunti 10 µl di *Biotin Antibody Cocktail* ogni 10⁷ cellule; si tratta di una miscela di anticorpi biotinilati specifici per i recettori che caratterizzano le popolazioni cellulari che devono essere eliminate (CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR-g/d, CD235a). Il campione viene quindi incubato per

10 min a 4°C. Vengono poi aggiunti 20 µl di *Anti Biotin MicroBeads* ogni 107 cellule (biglie magnetiche che legano i residui di biotina legati agli anticorpi) e si effettua

un'incubazione di 15 min a 4°C, dopodiché il campione viene portato a volume con il Buffer e centrifugato a 300 g per 10 min. Nel frattempo viene posizionata la colonna *LD Midi Max* sull'apposito supporto magnetico e viene idratata con 2 ml di Buffer. Quindi sotto la colonna viene posta una nuova provetta da 15 ml, il pellet contenente le PBMC viene risospeso in 500 µl di Buffer ogni 108 cellule e caricato in colonna. Quando il campione viene eluito vengono effettuati 3 lavaggi successivi con 3 ml di Buffer l'uno. Nella provetta posta sotto la colonna vengono così raccolte le cellule che non vengono trattenute (CD4⁺) perché non legate alle biglie magnetiche coniugate con gli anticorpi. La provetta contenente le CD4⁺ viene centrifugata a 300 g per 5 min ed il pellet risospeso in 90 µl di Buffer ogni 107 cellule (sempre facendo riferimento alla quantità iniziale di PBMC).

Vengono aggiunti 10 µl di *CD25 MicroBeads* ogni 107 cellule (biglie magnetiche coniugate all'anticorpo anti CD25), le quali si legheranno alle cellule che esprimono l'antigene di superficie corrispondente, per cui alla fine all'interno della colonna verranno trattenute le Treg (CD4⁺CD25⁺), mentre le Teff (CD4⁺CD25⁻) verranno eluite. Il campione viene incubato per 15 min a 4°C, portato a volume con il Buffer e centrifugato a 300 g per 10 min. Nel frattempo viene preparata la colonna *MS Mini Max* idratandola con 1 ml di Buffer. Il pellet viene risospeso in 500 µl di Buffer ogni 108 cellule e caricato in colonna dopo avervi posto sotto una nuova provetta da 15 ml; vengono quindi effettuati 3 successivi lavaggi con 2 ml di Buffer ciascuno. Al termine dell'eluizione la colonna viene trasferita in una nuova provetta da 15 ml, viene aggiunto 1 ml di Buffer e mediante l'apposito stantuffo viene esercitata una pressione meccanica per rompere i legami antigene-anticorpo e recuperare le cellule trattenute in essa (CD4⁺CD25⁺). A questo punto si ottengono 2 provette contenenti rispettivamente le Treg in un volume di 1 ml di Buffer e le Teff in circa 6-7 ml di Buffer, queste ultime vengono portate ad un volume noto (10 ml) e viene effettuata la conta di entrambi i campioni.

3.6 Colture cellulari

Le cellule sono state risospese ad una concentrazione finale di 1×10^6 cellule/ml in terreno di coltura RPMI 1640 arricchito con il 10% di FBS, L-glutammina (2 mM) e penicillina/streptomicina (10 U/ml). Le cellule sono state quindi poste in coltura in piastre da 6/24/96 pozzetti (Celbio, Pero, MI, Italia) ed incubate ad una temperatura di 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂, in presenza o in assenza di mitogeni (PHA [10 µg/ml] o antiCD3/CD28 [0.5 µg/ml]), per una durata di trattamento di 24/48/72 ore.

Sia la concentrazione che il tempo di incubazione della PHA sono stati scelti sulla base dei risultati di precedenti esperimenti (Cosentino et al., 2002a) in quanto in grado di indurre il massimo aumento di produzione di CA endogene nelle PBMC. Mentre per quanto riguarda gli anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 la concentrazione ed il periodo di incubazione sono stati ottimizzati sulla base di alcuni parametri funzionali cellulari come vitalità e proliferazione.

I diversi agenti farmacologici ionomicina (5 µM), interferon-β (700U/ml) e tumor necrosis factor-α (20 ng/ml) sono stati aggiunti 30 min prima del termine della coltura.

Nella co-coltura Treg-Teff sono stati utilizzati le seguenti sostanze: reserpina 1 µM, IFN- β (1000 U/ml), dopamina (1 µM), aggiunti immediatamente all'inizio della coltura di 48h in alcuni esperimenti, da soli o in presenza di agonisti ed antagonisti dopaminergici.

3.7 Isolamento dell'mRNA totale

L'mRNA totale è stato estratto dalle PBMC servendosi del PerfectPure™ RNA Cell & Tissue (5PRIME, GmbH) (Eppendorf, Germania), che utilizza una soluzione caotropica di guanidino isotiocianato per la lisi delle cellule e la rapida inattivazione delle RNAsi cellulari. Dopo una centrifugazione a 12000g per 5 min si è trasferito il surnatante in una nuova provetta e si sono aggiunti 350 µl di etanolo al 70% per favorire la precipitazione degli acidi nucleici. La matrice della colonna ha legato l'mRNA utilizzando un poliT, mentre i contaminanti sono stati eliminati grazie ad una serie di lavaggi seguiti da centrifugazioni di pochi secondi

che hanno garantito un grado di purezza adeguato. L'eluizione finale è stata compiuta con una soluzione 0.1% di dietilpirocarbonato (acqua DEPC) priva di RNAsi per evitare la digestione dell'RNA. Dopo un'incubazione a 50°C per 5 min e una centrifugazione a 12000g per 2 min i campioni così ottenuti sono stati conservati a -80°C.

L'mRNA estratto così estratto è stato quantificato mediante analisi spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nm. La purezza è stata valutata mediante il calcolo del rapporto delle assorbanza a 260/280 nm. Sono stati considerati adatti alla amplificazione i campioni con un rapporto superiore a 1.7.

3.8 Analisi mediante *Real Time*-PCR dell'mRNA di VMAT1 e VMAT2

L'mRNA totale è stato retrotrascritto utilizzando il prodotto commerciale *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied BiosystemTM, Foster City, USA). In breve, sono stati aggiunti a 25 ml di ciascun campione 25 ml della miscela così composta (*Master-mix solution*): 5 ml RT Buffer; 2 ml Miscela di deossinucleotidi trifosfati; 5 ml Random Primers (oligo dT); 10,5 ml Rnase-free H₂O; 2,5 ml Trascrittasi inversa (Multi Scribe RT).

I campioni così trattati sono stati quindi incubati in un termociclatore (Modello Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer Instruments, Bridgeport, CT, USA) nelle seguenti condizioni: un ciclo di 10 min a 25°C; un ciclo di 2 ore a 37°C; un ciclo di 5 sec a 4°C; un ciclo ∞ a 8°C. Il cDNA a singolo filamento, così preparato, è stato quantificato, mediante analisi spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260nm, ed infine conservato a -80°C fino al suo utilizzo.

La *Real Time* PCR è stata effettuata con un termociclatore Modello ABI Prism 7000 (Applied Biosystem, Foster City, CA) usando l'Assay sul kit per VMAT1, VMAT2 (Applied Biosystems, Foster City, USA). La reazione è stata allestita in una piastra da 96 pozzetti aggiungendo in ogni pozzetto: 12,5 ml di *UMM-Universal Master Mix* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA); 1,25 ml di Primer/Probe Reagents per l'*housekeeping gene*, 1,25 ml di Primer/Probe Reagents per il gene di interesse (VMAT1 e VMAT2) e 10 ml di campione di cDNA. La piastra è stata centrifugata per evitare che parte dei reagenti

rimanessero sulle pareti compromettendo i risultati e in seguito è stata posta all'interno del termociclatore dove ha avuto inizio la serie di cicli riportata in breve: due cicli iniziali di cui uno a 50°C per 2 min e l'altro a 95°C per 10 min per attivare la DNA polimerasi, e in seguito 40 cicli costituiti da: 15 min a 95°C per la denaturazione e 1 min a 60°C per l'*annealing* e l'estensione.

Mediante il programma ABI Prism SDS (Applied Biosystems, Foster City, USA) si valuta i valori del ciclo di amplificazione soglia (*Cycle Threshold*, CT). L'*housekeeping gene* è utilizzato come controllo in quanto espresso in modo costante nei linfociti. I risultati sono stati poi normalizzati in relazione ai valori di CT dell' *housekeeping gene* (in questo caso l'RNA ribosomale della subunità 18s) utilizzando la formula $2^{-(CT \text{ campione} - CT \text{ housekeeping gene})}$ ($2^{-\Delta CT}$).

3.9 Valutazione citofluorimetrica della % di positività delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ a VMAT2

Le cellule sono state oggetto di un test di immunofluorescenza indiretto, mediante l'utilizzo di anticorpi anti-*human* per CD3-APC, CD4-PE, CD8-PECy7 e VMAT2. Brevemente, l'analisi citofluorimetrica è stata effettuata su PBMC messi in coltura in condizioni di riposo e attivati con gli stimoli PHA e anti-CD3/CD28. Il campione è stato incubato con 20 µl di anticorpo anti-*human* CD3-APC e CD4-PE o con 20 µl di anticorpo anti-*human* CD3-APC e 5 µl di CD8-PECy7 per 15 min a temperatura ambiente ed al buio. Sono stati aggiunti 1 ml di PBS 1X. Successivamente il campione è stato centrifugato a 250g per 5 min e risospeso con 50 µl di PBS 1X. Sono stati aggiunti 100 µl di FIX per 15 min a temperatura ambiente ed al buio. Il campione è stato lavato con 3 ml di PBS e in seguito centrifugato. Il pellet è stato risospeso con 100 µl di PERM e sono stati aggiunti 4 µl di anticorpo anti VMAT2 (1:2500) per 30 min a temperatura ambiente ed al buio. Il campione, lavato con 3 ml di PBS e centrifugato, è stato trattato con 100 µl di PERM e con FITC-GAR (1:400) di anticorpo secondario per 30 min a temperatura ambiente ed al buio. Dopo il lavaggio con 3 ml di PBS 1 X e successiva centrifugazione a 250g per 5 min, il *pellet* è stato risospeso in 300 µl di soluzione PBS 1X pronto così per la lettura al citometro.

L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata mediante l'utilizzo di un citofluorimetro (Modello BD FACSCAsnto II), e per ogni campione sono state analizzate un minimo di 2×10^4 cellule. Come mostrato in figura 3, la strategia adottata comprende l'identificazione dei linfociti totali mediante analisi morfologica, utilizzando i parametri di Forward scatter (FSC, cioè la luce diffusa frontalmente dalla cellula quando questa viene illuminata dal raggio laser) e Side scatter (SSC, cioè la luce diffusa perpendicolarmente quando la cellula viene illuminata dal raggio laser). Definito il gate dei linfociti totali, successivamente sono stati individuati i linfociti CD3+ plottando il parametro morfologico (FSC) con la fluorescenza per il CD3+ coniugato in APC. Dai linfociti CD3+ sono stati identificati i linfociti CD4+ e CD8+, plottando rispettivamente il parametro morfologico (FSC) con la fluorescenza per il CD4+ coniugato in PE e per il CD8+ coniugato in PE. Successivamente è stata valutata la positività dei linfociti di interesse per VMAT2 mediante un istogramma di fluorescenza dove il cursore è stato posto nel punto che delinea il confine tra zona negativa e zona positiva rispetto al controllo negativo.

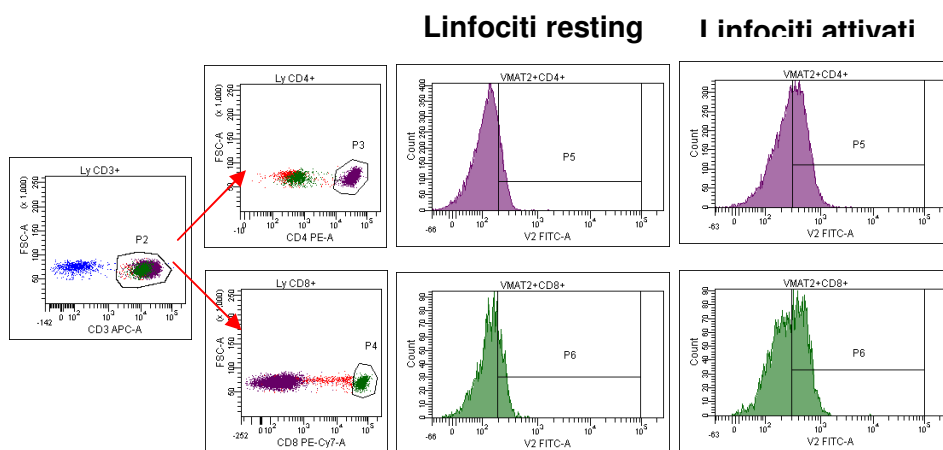


Fig. 3.9.1 Analisi citofluorimetrica di VMAT2 su linfociti CD4+ e CD8+. I dati sono stati analizzati con il software BD FACSDiva software (version 6.1.3) e espressi come media \pm SD della percentuale di cellule positive per VMAT2 (%) per ogni sottopopolazione di interesse e della densità recettoriale di VMAT2 sulle cellule positive (mean channel fluorescence intensity (MFI)).

3.10 Adesione delle PBMC a vetrini polilisinati

I vetrini sterili di diametro 25 mm (Tiesselab, Milano, Italia) sono stati posti in piastre da 6 pozzetti (Celbio, Pero, MI, Italia). La Poli-L-lisina, a concentrazione 0.1 mg/mL, è stata posta sui vetrini per 10 min a temperatura ambiente. I vetrini polilisinati sono stati lavati con acqua sterile e asciugati in stufa ventilata per 30 min. circa. 1×10^6 cellule/0.5 mL sono state poste sul vetrino polisinato ed incubate ad una temperatura di 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂ per 1 h.

3.11 Immunocitochimica

Le cellule di interesse sono, fissate in paraformaldeide al 4% in PBS, sono state depositate su vetrini rivestiti di gelatina e lasciate seccare over nigh (o.n).

I vetrini reidratati in PBS sono stati trattati brevemente con Glicina 0.1M in PBS (pH 7.4) e con un buffer costituito da 0.3% Triton X-100.

I vetrini sono stati incubati o.n. a 4°C con anticorpi primari: Guinea Pig anti-VMAT2 (1:50) e goat anti-DBH (1:30), lavati e successivamente incubati a temperatura ambiente. Per 1 ora con anticorpi secondari: 488-conjugated donkey anti-Guinea Pig (1:100) e rhodamine-conjugated donkey anti-goat (1:100).

Per la marcatura del nucleo i vetrini sono stati trattati con Toto-3 iodide (642/660) (1:400) per 10 min a temperatura ambiente.

Dopo un lavaggio finale, i vetrini sono stati montati con glicerolo al 95% in PBS ed osservati al microscopio confocale Radiance 2100 (Biorad Laboratories, Hercules CA) equipaggiato con un Laser Kripon/Argon e un red laser diode, mediante l'utilizzo di un obiettivo 60X e uno zoom 3,5X.

3.12 Identificazione e dosaggio delle CA mediante HPLC-ED

Al termine del periodo di coltura, le cellule sono state centrifugate per 5 min a 1400 rcf a 23°C per separarle dal medium di coltura.

Per la determinazione delle CA contenute nel medium è stato aggiunto HClO₄ 0,4 N (1:1 vol/vol), i campioni così composti sono stati centrifugati per 30 min a 30000 rcf a 20°C per far precipitare le proteine sieriche. Per la determinazione

delle CA intracellulari, il pellet è stato risospeso con HClO_4 0,1 N, sottoposto a sonicazione per 1 min, al fine di lisare la membrana cellulare e liberare le CA contenute, la sospensione è stata infine centrifugata per 30 min a 30000 rcf a 20°C.

Dopo centrifugazione ogni campione è stato filtrato (Millex-HV13, 0,45 μm ; Millipore, Bedford, MA) e 50 μl di ciascuno è stato iniettato nel sistema cromatografico HPLC-ED per il dosaggio delle CA.

Dopo centrifugazione ogni campione è stato filtrato (Millex-HV13, 0,45 μm ; Millipore, Bedford, MA) e quindi iniettato nel sistema cromatografico HPLC-ED (High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection) per il dosaggio delle CA.

Il sistema HPLC consiste in una pompa a due pistoni (modello LC-10ADVP, Shimadzu, Kyoto, Giappone), una colonna analitica a fase inversa a scambio ionico Beckman ultrasphere IP C_{18} -5 μm provvista di una pre-colonna ultrasphere IP C_{18} (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), un autocampionatore (Modello HT300L, HTA, Brescia, Italia), un detector elettrochimico (Modello 5600A CoulArray, ESA, Chelsford, MA, USA) con una cella analitica coulometrica impostata a quattro potenziali differenti (Modello 6210, ESA).

Il potenziale del primo canale è stato impostato a +150 mV, il secondo a +250 mV, il terzo a +300 mV ed il quarto a -200 mV. I cromatogrammi sono stati acquisiti, elaborati e processati mediante un sistema computerizzato (Modello CoulArrayWin Versione 1.04, ESA).

La fase mobile è costituita da H_2O filtrata/acetonitrile (90.7:9.3 v/v), NaEDTA 0,6264 mM, KH_2PO_4 0,349 mM e octansolfonato sodico 0,6264 mM. Il pH della soluzione è stato misurato e fissato ad un valore di 3.20 utilizzando H_3PO_4 puro; la fase mobile viene poi filtrata (Filtri Millipore 0.45 μm), e successivamente fatta ricircolare attraverso il sistema ad un flusso costante di 0.8 ml/min. Ogni campione è stato iniettato direttamente nel sistema HPLC. Il volume di iniezione era pari a 50 μl . Il limite di rilevabilità del sistema cromatografico in tali condizioni era di fmoli per ogni campione analizzato. Il sistema permette il

dosaggio di alcune molecole di interesse biologico e farmacologico, fra cui DA, NE e E, ed i loro principali metaboliti.

La quantità di CA è stata calcolata utilizzando una curva di calibrazione costruita a partire dai valori delle aree dei picchi cromatografici ottenuti dall'analisi di campioni contenenti le CA in concentrazioni note (3.0 fmol – 2,4 pmol). Nel caso delle CA intracellulari, i valori dei campioni sono stati espressi in pmol/mg di proteine.

3.13 Analisi statistica dei dati

I risultati sono stati espressi come Media \pm Deviazione Standard (DS) di ogni gruppo sperimentale. La significatività statistica delle differenze tra i gruppi è stata calcolata mediante il test del *t* di Student. L'analisi delle relazioni concentrazione-risposta è stata effettuata mediante un programma per computer disponibile in commercio (GraphPad Prism versione 5.00 per Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

4 RISULTATI

4.1 Espressione genica di VMAT1 e VMAT2 nelle PBMC umane

Per valutare l'espressione genica di VMAT1 sono stati condotti $n = 3$ esperimenti sulle PBMC messe in coltura a riposo e stimulate con la fitoemagglutinina (PHA) ($10 \mu\text{g/ml}$), mitogeno policlonale che mima l'attivazione fisiologica dei linfociti che si verifica dopo la presentazione dell'antigene, e con gli anticorpi anti-CD3/anti-CD28 per 24, 48 e 72 ore. Lo strumento non ha rilevato alcun segnale prodotto dall'amplificazione di VMAT1 all'interno dell'intervallo stabilito sulla base delle prove di linearità effettuate per questa sonda, sia nelle PBMC stimulate che in quelle non sottoposte a trattamento.

Per quanto riguarda il trascritto genico di VMAT2 sono stati effettuati $n = 7$ esperimenti che hanno evidenziato, invece, la presenza del segnale dell'mRNA di tale isoforma del trasportatore.

In presenza degli stimoli PHA e anticorpi anti-CD3/anti-CD28 l'espressione dell'mRNA di VMAT2 nelle PBMC risulta aumentata dalle 3 alle 5 volte sotto stimolo a 24 e 48 ore, se comparata ai rispettivi controlli ("resting").

La valutazione dell'espressione genica di VMAT2 (ciclo soglia, Ct1) è stata ottenuta dai valori di Ct, normalizzati sulla base del valore del RNA ribosomiale 18S (Ct2) e espressi come $2^{-\Delta\text{Ct}}$ per ciascun gene in ogni campione. I dati ottenuti con questa metodica sono stati espressi come media \pm DS e ne è stata valutata la significatività statistica (Tab. 4.1, Fig. 4.1).

Tempo	PBMC Resting	PBMC+PHA	PBMC+Anticorpi anti-CD3/anti-CD28
0 h	$9,85 \times 10^{-9} \pm 4,96 \times 10^{-9}$		
24 h	$1,53 \times 10^{-8} \pm 1,07 \times 10^{-8}$	$3,89 \times 10^{-8} \pm 3,23 \times 10^{-8}$	$3,35 \times 10^{-8} \pm 1,88 \times 10^{-8}$
		$p = 0.044$	$p = 0.004$
48 h	$2,67 \times 10^{-8} \pm 2,62 \times 10^{-8}$	$1,01 \times 10^{-7} \pm 6,05 \times 10^{-8}$	$1,39 \times 10^{-7} \pm 1,11 \times 10^{-7}$
		$p = 0.009$	$p = 0.011$
72 h	$1,97 \times 10^{-8} \pm 9,54 \times 10^{-9}$	$5,72 \times 10^{-8} \pm 4,73 \times 10^{-8}$	$5,47 \times 10^{-8} \pm 9,41 \times 10^{-8}$
		$p = 0.081$	$p = 0.173$

Tabella 4.1. La tabella mostra la media dei valori ricavati dai dati di Real-time PCR di $n = 7$ esperimenti condotti, affiancata dalla DS. Inoltre, è stato stimato il valore di p mediante Student's t-test per dati appaiati.

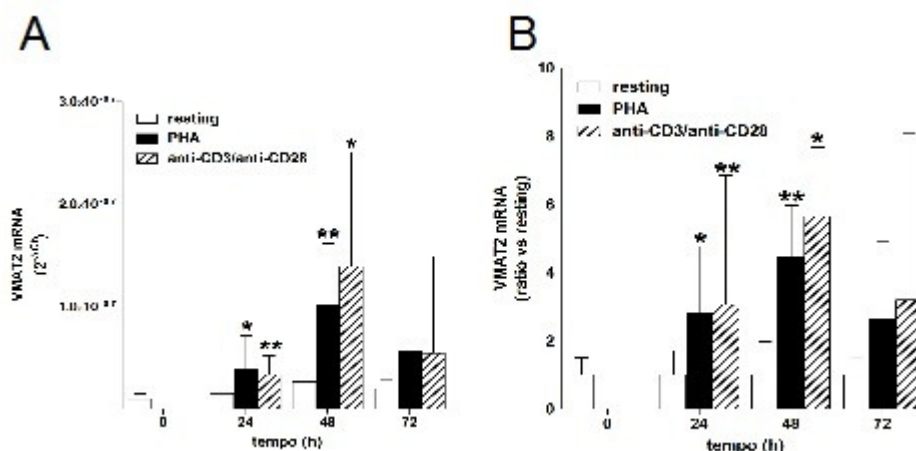


Figura 4.1. Analisi dell'espressione dell'mRNA di VMAT2 nelle PBMC umane in Real-time PCR I grafici mostrano i dati relativi a $n = 7$ esperimenti condotti per valutare l'espressione genica di VMAT2. Le colonne indicano il valore medio ottenuto, mentre le barre rappresentano la DS calcolata. Nel pannello A sono riportati i valori assoluti dell'espressione genica di VMAT2, mentre nel pannello B il grafico riporta i valori di espressione in rapporto ai valori ottenuti nelle preparazioni di controllo ("resting") al medesimo intervallo di tempo. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ vs i rispettivi controlli ("resting") mediante Student's t-test per dati appaiati.

4.2 Espressione genica di VMAT2 nelle sottopopolazione linfocitarie CD4⁺ e CD8⁺

Per valutare l'espressione genica di VMAT2 sono stati condotti $n = 4$ esperimenti sui linfociti CD4⁺ e CD8⁺ altamenti purificati da colture di PBMC. In presenza dello stimolo PHA l'espressione dell'mRNA di VMAT2 nelle cellule CD4⁺ risulta aumentata di 11 volte sotto stimolo a 48 ore, se comparata ai rispettivi controlli. Nei linfociti CD8⁺ il mitogeno PHA induce un'aumento del gene VMAT2 di circa 23 volte a 48 ore rispetto ai relativi controlli.

La valutazione dell'espressione genica di VMAT2 (ciclo soglia, Ct1) è stata ottenuta dai valori di Ct, normalizzati sulla base del valore del RNA ribosomiale 18S (Ct2) e espressi come $2^{-\Delta Ct}$ per ciascun gene in ogni campione. I dati ottenuti con questa metodica sono stati espressi come media \pm DS e ne è stata valutata la significatività statistica (Tab. 4.2, Fig. 4.2).

CD4 ⁺		CD8 ⁺	
resting	PHA	resting	PHA
$1,44 \times 10^{-8}$ $\pm 5,37 \times 10^{-9}$	$1,59 \times 10^{-7}$ $\pm 4,92 \times 10^{-8}$	$9,63 \times 10^{-9}$ $\pm 2,56 \times 10^{-9}$	$2,24 \times 10^{-7}$ $\pm 1,01 \times 10^{-7}$
	$p = 0,004$		$p = 0,01$

Tabella 4.2. La tabella mostra la media dei valori ricavati dai dati di Real-time PCR di $n = 4$ esperimenti condotti, affiancata dalla DS. Inoltre, è stato stimato il valore di p mediante Student's t-test per dati appaiati.

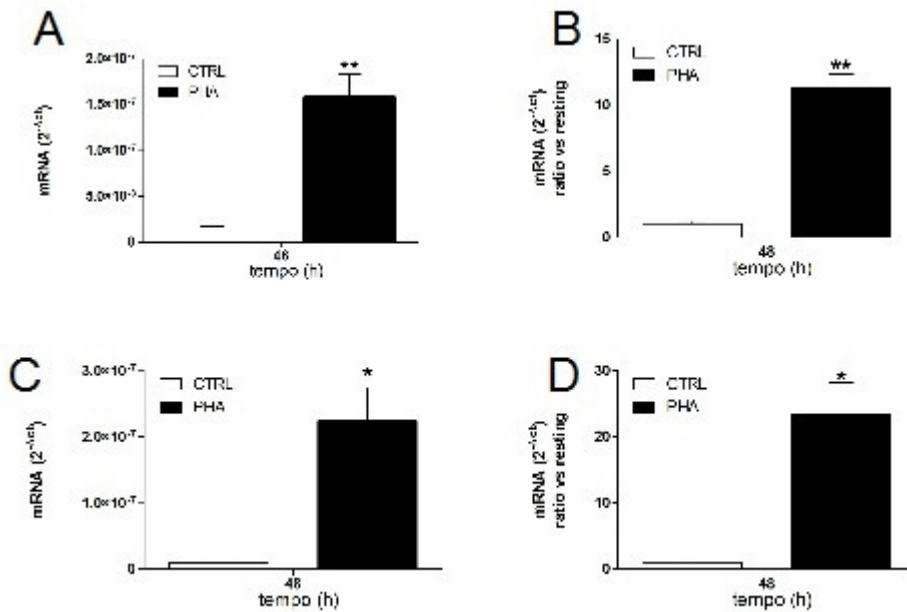


Figura 4.2. Analisi dell'espressione dell'mRNA di VMAT2 nei linfociti CD4⁺ e CD8⁺ I grafici mostrano i dati relativi a n = 4 esperimenti condotti per valutare l'espressione genica di VMAT2. Le colonne indicano il valore medio ottenuto, mentre le barre rappresentano la DS calcolata. Nei pannelli A e C sono riportati i valori assoluti dell'espressione genica di VMAT2 rispettivamente nei linfociti CD4⁺ e CD8⁺. Nei pannelli B e D il grafico riporta i valori di espressione in rapporto ai valori ottenuti nelle preparazioni di controllo ("resting") al medesimo intervallo di tempo rispettivamente nei linfociti CD4⁺ e CD8⁺. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$ vs i rispettivi controlli ("resting") mediante Student's t-test per dati appaiati.

4.3 Espressione proteica di VMAT2 nella sottopolazione linfocitaria CD4⁺

Per valutare l'espressione proteica di VMAT2 sono stati condotti n = 6 esperimenti sulle PBMC messe in coltura a riposo e stimulate con PHA e anticorpi anti-CD3/anti-CD28 per 48 e 72 ore. L'analisi citofluorimetrica ha rilevato che la percentuale di cellule CD3⁺CD4⁺ positive a VMAT2 nei linfociti isolati a T0 risulta essere pari in media a $5,81 \pm 3,48$. Entrambi gli stimoli, PHA e anticorpi anti-CD3/anti-CD28, inducono un aumento significativo della percentuale di cellule CD3⁺CD4⁺ positive a VMAT2. L'aumento osservato con PHA è intorno a $55,04 \pm 4,9$ con PHA (48 ore) e a $50,64 \pm 18,37$ (72 ore). Con il trattamento anticorpi anti-CD3/anti-CD28 si osserva un aumento pari a $50,97 \pm 24,49$ (48 ore) e a $55,67 \pm 19,62$ (72 ore) (Fig. 4.3).

L'analisi citofluorimetrica mostra, oltre ad un aumento significativo della percentuale di CD3⁺CD4⁺ positive a VMAT2, anche un aumento dell'MFI. L'MFI a T0 risulta essere pari in media a 250,00 ± 31,86. Esso aumenta in seguito al trattamento sia con PHA sia con gli anticorpi anti-CD3/anti-CD28 rispetto ai relativi controlli. L'aumento risultata essere pari a 533,80 ± 83,14 (48 ore) e a 544,8 ± 141,08 (72 ore) con PHA e a 484,7 ± 13,28 (48 ore) e a 451,3 ± 136,1 (72 ore) con anticorpi anti-CD3/anti-CD28 (Fig. 4.3).

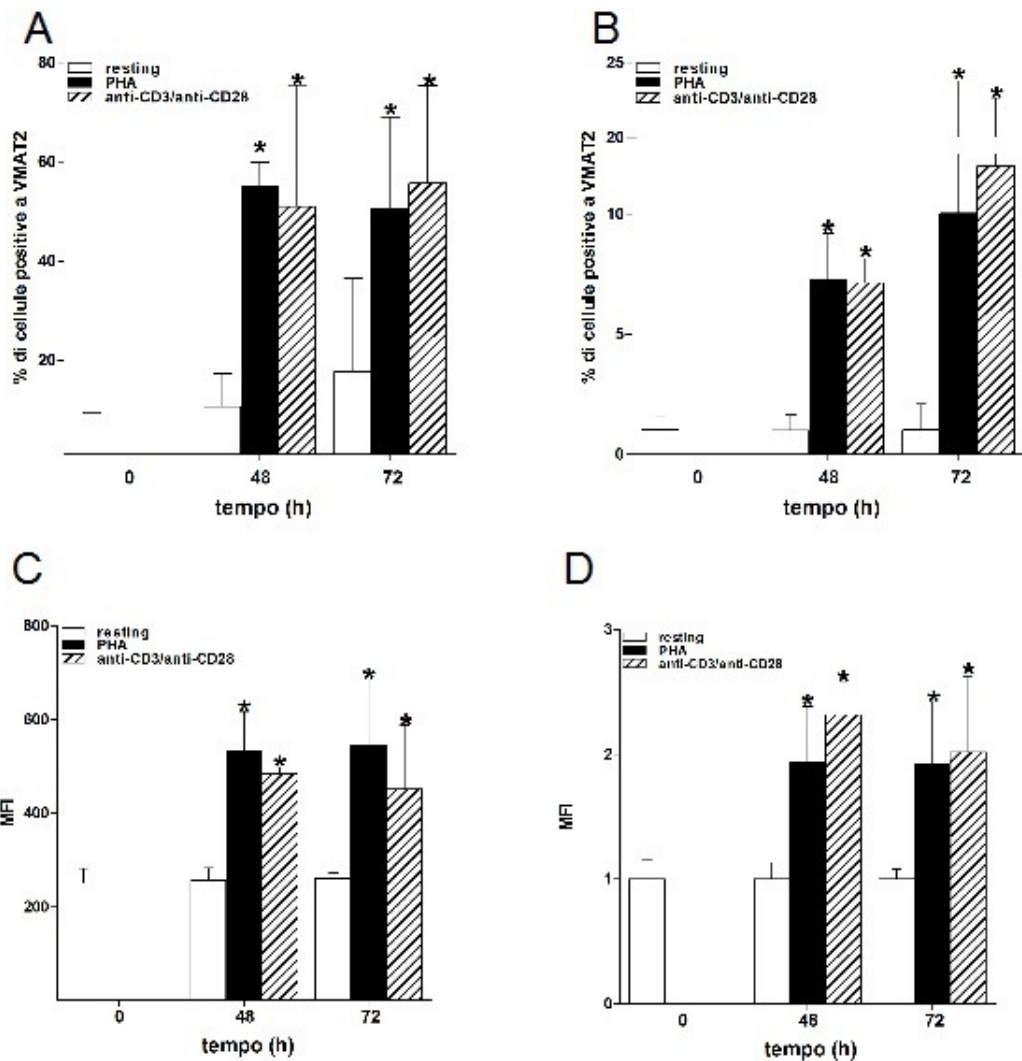


Figura 4.3. Analisi dell'espressione di VMAT2 nelle sottopopolazioni linfocitarie CD4⁺ mediate citofluorimetria

I grafici mostrano i dati relativi a n = 6 esperimenti per le CD4⁺ condotti per valutare l'espressione della proteina VMAT2. Le colonne indicano il valore medio ottenuto, mentre le barre rappresentano la DS calcolata. I pannelli A e B rappresentano la percentuale di CD4⁺ positive a

VMAT2. I pannelli C e D rappresentano l'MFI. Nei pannello A e C sono riportati i valori assoluti, mentre nei pannelli B e D i grafici riportano i valori in rapporto a quelli ottenuti nelle preparazioni di controllo ("resting") al medesimo intervallo di tempo. * = $p < 0.01$ vs i rispettivi controlli ("resting") mediante Student's t-test per dati appaiati.

4.4 Espressione proteica di VMAT2 endogeno nella sottopopolazione linfocitaria CD8⁺

L'analisi dell'espressione proteica di VMAT2 è stata eseguita su $n = 6$ esperimenti. Le PBMC sono state messe in coltura a riposo e stimolate con PHA e anticorpi anti-CD3/anti-CD28 per 48 e 72 ore. L'analisi citofluorimetrica ha rilevato che la percentuale di cellule CD3⁺CD8⁺ positive a VMAT2 nei linfociti isolati a T0 risulta essere pari in media a $8,41 \pm 4,67$. Entrambi gli stimoli, PHA e anticorpi anti-CD3/anti-CD28, inducono un aumento significativo della percentuale di cellule CD3⁺CD8⁺ positive a VMAT2. L'aumento osservato con PHA è intorno a $48,2 \pm 4,3$ con PHA (48 ore) e a $46,90 \pm 9,20$ (72 ore). Con il trattamento anticorpi anti-CD3/anti-CD28 si osserva un aumento pari a $48,23 \pm 20,76$ (48 ore) e a $53,77 \pm 20,81$ (72 ore) (Fig. 4.4).

L'analisi citofluorimetrica mostra anche un aumento dell'MFI. L'MFI a T0 risulta essere pari in media a $286,29 \pm 42,89$. Esso aumenta significativamente in seguito al trattamento sia con PHA sia con gli anticorpi anti-CD3/anti-CD28 rispetto ai relativi controlli.

L'aumento risultata essere pari a $543,20 \pm 73,89$ (48 ore) e a $549,20 \pm 97,24$ (72 ore) con PHA e a $635,70 \pm 40,99$ (48 ore) e a $580,00 \pm 145,60$ (72 ore) con anticorpi anti-CD3/anti-CD28 (Fig. 4.4).

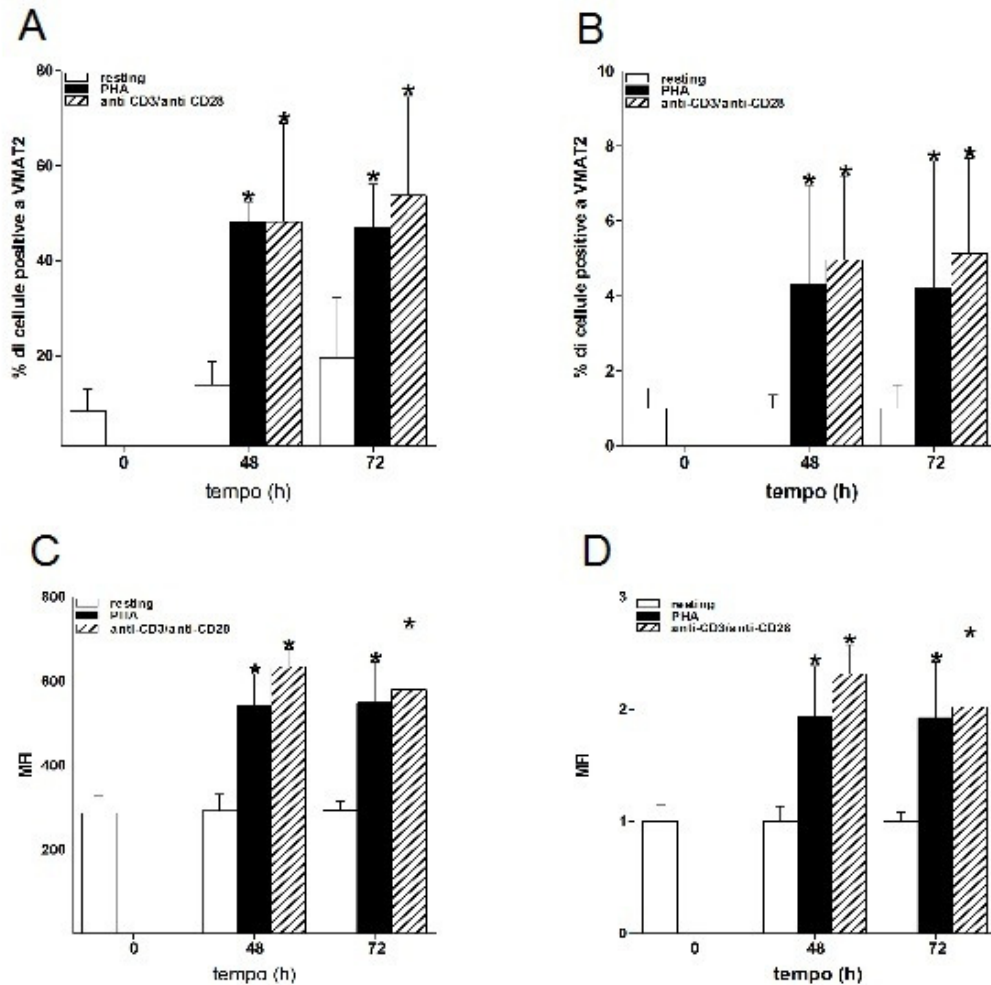


Figura 4.4. Analisi dell'espressione di VMAT2 nelle sottopopolazioni linfocitarie CD8⁺ mediate citofluorimetria

I grafici mostrano i dati relativi a n = 6 esperimenti per le CD8⁺ condotti per valutare l'espressione della proteina VMAT2. Le colonne indicano il valore medio ottenuto, mentre le barre rappresentano la DS calcolata. I pannelli A e B rappresentano la percentuale di CD8⁺ positive a VMAT2. I pannelli C e D rappresentano l'MFI. Nei pannello A e C sono riportati i valori assoluti, mentre nei pannelli B e D i grafici riportano i valori in rapporto a quelli ottenuti nelle preparazioni di controllo ("resting") al medesimo intervallo di tempo. * = $p < 0.005$ vs i rispettivi controlli ("resting") mediante Student's t-test per dati appaiati.

4.5 Esperimenti di immunofluorescenza e analisi al confocale

La caratterizzazione del trasportatore VMAT2 nelle sottopopolazioni linfocitarie umane CD4⁺ e CD8⁺ è stata effettuata mediante esperimenti di immunofluorescenza e analisi al confocale.

I linfociti di interesse provenienti da colture di PBMC a riposo e stimulate con PHA, sono stati marcati con l'anticorpo anti-VMAT2 (1:50) e anti-DBH (1:30) (Immunological Sciences) e analizzate al microscopio confocale. Le cellule sono state acquisite al confocale mediante l'utilizzo di un obiettivo 60X e uno zoom 3,5X.

I risultati in Fig. 4.5, mostrano che VMAT2 e DBH sono copresenti nel citoplasma nelle sottopopolazioni linfocitarie prese in esame. Il trasportatore presenta una localizzazione puntiforme mentre l'enzima è più diffuso nel citoplasma.

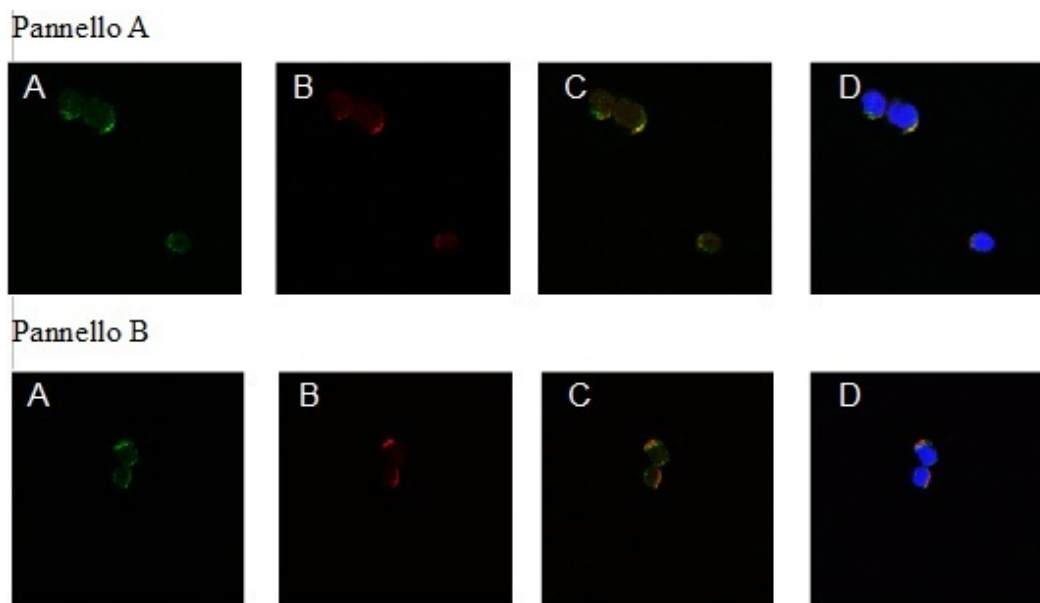


Figura 4.5 Espressione di VMAT2 e DBH nei linfociti CD4⁺ e CD8⁺

Le immagini al confocale rappresentano i linfociti CD4⁺ (Pannello A) e CD8⁺ (Pannello B) stimulate con PHA (10 µg/ml) per 48 h e poi marcate con gli anticorpi anti-VMAT2 (A), anti-DBH (B) e un marcatore dei nuclei TOTO 3 (D). Le immagini C mostrano l'overlay di VMAT2 e DBH nei linfociti di interesse.

4.6 Effetti della ionomicina, interferon beta (IFN- β) e tumor necrosis factor alpha (TNF- α) sul rilascio delle CA nelle PBMC umane

L'analisi sul rilascio delle CA endogene nelle PBMC umane è stata eseguita su n = 5 esperimenti.

In accordo con i risultati di precedenti studi (Marino et al., 1999; Cosentino et al., 2002), in colture di PBMC umane sono misurabili quantità di DA, NA e A nell'ordine delle pmol/mg di proteine le quali aumentano significativamente in presenza del mitogeno PHA (10 μ g/ml) (Tab 4.3).

L'incubazione con ionomicina (5 μ M) e IFN- β (700 UI), 30 min prima del termine della coltura, induce una riduzione del contenuto intracellulare di DA, NA e A accompagnato da un corrispondente aumento dei livelli extracellulari (Tab 4.4, Fig. 4.6).

	PBMC resting <i>cellule</i> (pmol/mg)	PBMC + PHA <i>cellule</i> (pmol/mg)	<i>p</i>
DA	0,33 \pm 0,47	6,32 \pm 2,67	<i>p</i> = 0,004
NA	1,35 \pm 0,63	9,82 \pm 3,3	<i>p</i> = 0,001
A	0,79 \pm 0,53	7,27 \pm 2,46	<i>p</i> = 0,002

Tabella 4.3. La tabella mostra la media dei valori ricavati dai dati di HPLC di n = 5 esperimenti condotti, affiancata dalla DS. Inoltre, è stato stimato il valore di *p* mediante Student's t-test per dati appaiati.

	PBMC + PHA <i>Cellule</i> (pmol/mg)				PBMC + PHA <i>medium</i> (pmol/mg)				PBMC + PHA <i>cellule+medium</i> (pmol/mg)			
	Controllo	Ionomicina	IFN-β	TNF-α	Controllo	Ionomicina	IFN-β	TNF-α	Controllo	Ionomicina	IFN-β	TNF-α
DA	6,32± 2,67	0,08± 0,07	0,11± 0,07	5,98± 1,57	9,34± 8,23	52,80± 13,48	52,62± 24,19	7,05± 3,25	13,79± 10,64	52,89± 13,47	52,73± 24,21	13,03± 4,66
										$p = 0,02$		$p = 0,04$
NA	9,82± 3,27	1,60± 0,64	1,15± 0,52	9,18± 1,79	40,00± 9,01	101,28± 29,56	108,38± 50,31	32,6± 14,22	49,84± 10,47	102,48± 14,06	109,53± 54,54	41,79± 13,34
										$p = 0,04$		
A	7,27± 2,47	0,28± 0,10	0,98± 1,50	5,15± 2,94	61,35± 58,63	40,12± 17,69	84,58± 74,78	54,95± 49,88	88,24± 63,36	40,27± 17,74	85,32± 76,05	61,76± 49,2

Tabella 4.4 La tabella mostra l'effetto dell'incubazione di 30 min con ionomicina (5 μM), IFN-β (700 UI) TNF-α (20 ng/ml) sulle quantità di DA, NA e A nelle colture di PBMC. I dati sono espressi come media ± DS di n = 5 esperimenti condotti. Inoltre, è stato stimato il valore di p mediante Student's t-test per dati appaiati.

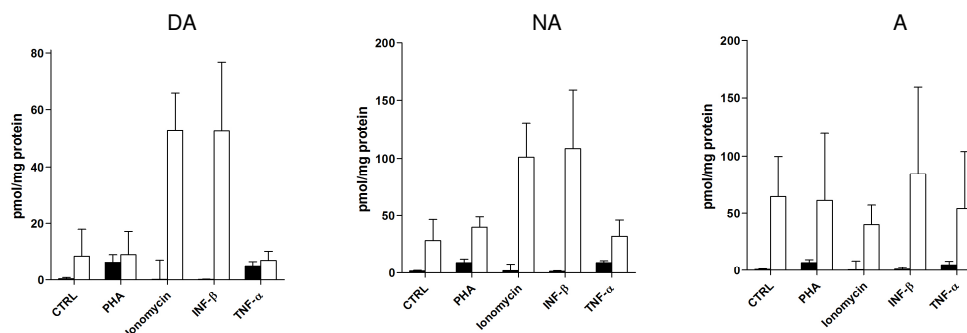


Figura 4.6. Effetti della inomicina (5 μ M), IFN- β (700 UI) e TNF- α (20 ng/ml) sul rilascio delle CA nelle PBMC. La ionomicina e IFN- β inducono una diminuzione della quantità di CA a livello intracellulare.

4.7 Effetti dell'interferon beta (IFN- β) sul rilascio delle CA nella sottopopolazione linfocitaria CD4⁺

Dati preliminari sui linfociti CD4⁺ altamente purificati da colture di PBMC mostrano che sono misurabili quantità di DA, NA e A nell'ordine delle pmol/mg di proteine le quali aumentano in presenza del mitogeno PHA (10 μ g/ml) (Tab 4.5).

L'incubazione con IFN- β (700 UI), 30 min prima del termine della coltura, induce una riduzione del contenuto intracellulare di DA, NA e A accompagnato da un corrispondente aumento dei livelli extracellulari (Tab 4.6).

	CD4 ⁺ resting <i>cellule</i> (pmol/mg)	CD4 ⁺ + PHA <i>cellule</i> (pmol/mg)
DA	0,26	8,05
NA	5,58	30,04
A	0,69	12,23

Tabella 4.5 La tabella mostra i valori ricavati dai dati di HPLC di n = 1 esperimento condotto.

	CD4 ⁺ + PHA <i>cellule</i> (pmol/mg)		CD4 ⁺ + PHA <i>medium</i> (pmol/mg)		CD4 ⁺ + PHA <i>cellule+medium</i> (pmol/mg)	
	Controllo	IFN-β	Controllo	IFN-β	Controllo	IFN-β
DA	8,05	n.q.	n.q.	8,49	8,05	8,49
NA	30,04	0,93	8,32	26,3	38,36	27,23
A	12,23	0,28	1,94	17,03	14,17	17,31

Tabella 4.6 La tabella mostra i valori ricavati dai dati di HPLC di n = 1 esperimento condotto. n.q, valori non quantificabili.

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

L'obiettivo di questo corso di dottorato è stato quello di analizzare specifiche strutture fondamentali per il funzionamento e la caratterizzazione dei circuiti catecolaminergici. In particolare, ho caratterizzato i sistemi intracellulari e i meccanismi molecolari implicati nel processo di assorbimento, stoccaggio e rilascio delle CA nei linfociti umani, poiché nelle PBMC umane, oltre alla presenza di una sintesi di CA endogene, si evidenzia l'espressione di VMAT1 e 2 (Watson et al., 1999) anche se le informazioni attuali sulla espressione e sulla funzionalità di tali trasportatori in questo tipo di cellule sono piuttosto limitate e necessitano di ulteriori indagini.

Il piano sperimentale ha previsto: (i) l'analisi dell'espressione genica di VMAT1 e 2; (ii) l'analisi dell'espressione e della localizzazione intracellulare di VMAT2 endogeno nei linfociti umani totali e nelle sottopopolazioni linfocitarie CD4⁺, CD8⁺ e Treg; (iii) l'analisi dei processi di rilascio delle CA nei linfociti umani.

La prima parte del lavoro ha compreso l'analisi dell'espressione genica del trasportatore vescicolare delle monoamine di tipo 1 e 2 (VMAT1 e 2) endogeno nei linfociti umani.

Dalle analisi condotte mediante Real-time PCR su preparazioni di cellule mononucleate di sangue umano periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) in coltura a riposo e stimulate con PHA e anticorpi anti-CD3/anti-CD28 per 24, 48 e 72 ore, l'espressione genica di VMAT1 risulta essere assente o in ogni caso al di sotto dei limiti di rilevazione. Lo strumento, infatti, non ha rilevato alcun segnale prodotto dall'amplificazione di VMAT1 all'interno dell'intervallo stabilito sulla base delle prove di linearità effettuate per questa sonda. Al contrario, il segnale indice della presenza del trascritto del gene di VMAT2 nelle PBMC in coltura è stato rilevato in tutte le preparazioni. In presenza degli stimoli PHA e anticorpi anti-CD3/anti-CD28 l'espressione dell'mRNA di VMAT2 nelle PBMC risulta aumentata dalle 3 alle 5 volte sotto stimolo a 24 e 48 ore, se comparata ai rispettivi controlli.

Sulla base dei risultati ottenuti, l'attenzione si è focalizzata, quindi, su quest'ultima isoforma per l'analisi dell'espressione genica e proteica di VMAT2 nelle principali sottopopolazioni linfocitarie CD4⁺ e CD8⁺ mediante Real-time PCR, analisi

citofluorimetrica, esperimenti di immunofluorescenza e analisi al microscopio confocale.

L'analisi di Real Time PCR mostra che, in seguito a stimolazione con PHA l'espressione di VMAT2 aumenta significativamente in entrambe le sottopopolazione linfocitarie di interesse altamente purificate da colture di PBMC.

L'analisi citofluorimetrica di VMAT2 su preparazione di PBMC in coltura a riposo e stimolate con PHA e anticorpi anti-CD3/anti-CD28 per 48 e 72 ore indica un aumento significativo dalle 6 alle 9 volte della percentuale di cellule CD4⁺ positive a VMAT2, come anche dell'espressione del trasportatore per cellula di circa il doppio. Si è osservato che entrambi gli stimoli inducono un aumento significativo della percentuale di cellule CD8⁺ positive a VMAT2 dalle 52 alle 68 volte e dell'espressione della proteina di interesse di circa il doppio.

Gli esperimenti di microscopia su linfociti CD4⁺ e CD8⁺ altamente purificati da colture di PBMC mostrano che VMAT2 e DBH sono copresenti nel citoplasma. Il trasportatore presenta una localizzazione puntiforme mentre l'enzima è più diffuso nel citoplasma.

La seconda parte dello studio ha compreso l'analisi dei processi di rilascio delle CA endogene con particolare attenzione ad una possibile modulazione da parte di diversi agenti sia fisiologici che farmacologici nelle PBMC umane stimolate con il mitogeno policlonale PHA.

In accordo con i risultati di precedenti studi (Marino et al., 1999; Cosentino et al., 2002), in colture di PBMC umane sono misurabili quantità di DA, NA e A nell'ordine delle pmol/mg di proteine le quali aumentano di circa sei volte in presenza del mitogeno PHA (10 µg/ml).

L'incubazione con ionomicina (5 µM) e INF-β (700 UI), 30 min prima del termine della coltura, induce una riduzione del contenuto intracellulare di DA, NA e A accompagnato da un corrispondente aumento dei livelli extracellulari.

Dati preliminari su linfociti CD4⁺ altamente purificati da colture di PBMC indicano quantità misurabili di DA, NA e A nell'ordine delle pmol/mg di proteine le quali aumentano in seguito a stimolazione. L'agente fisiologico INF-β (700 UI)

induce una diminuzione del contenuto intracellulare di tali CA seguito da un relativo aumento dei livelli extracellulari.

Questi dati supportano la presenza, oltre di un sistema di sintesi delle CA, anche di un meccanismo di immagazzinamento e rilascio delle CA endogene che può essere influenzato da diversi agenti fisiologici e/o farmacologici.

Studi condotti negli anni '90 sui ratti e sui bovini hanno rilevato l'esistenza di due isoforme della proteina trasportatrice: VMAT1 (SLC18A1) e VMAT2 (SLC18A2) con identità di circa il 62%. L'isoforma 1 è risultata essere prevalentemente presente nelle cellule endocrine e paracrine degli organi periferici, mentre VMAT2 è stato identificato anche nei neuroni del cervello e simpatici, in cellule contenenti istamina dello stomaco, nella midollare del surrene e nelle cellule del sangue (Henry et al.,1998; Masson et al., 1999). Dai risultati ottenuti, i linfociti umani e le principali sottopopolazioni linfocitarie esprimono la proteina VMAT2 e non l'isoforma 1, assente a livello di espressione genica sia nelle cellule attivate che in quelle a riposo. Questi risultati sono in disaccordo con l'unico studio attualmente disponibile nei linfociti umani di Amenta et al. (2001). Tale gruppo di ricerca, attraverso microscopia confocale, ha rilevato una debole immunoreattività di VMAT1 diffusa nel citoplasma linfocitario, e una moderata immunoreattività di VMAT2 localizzata in aree citoplasmatiche puntiformi e, in minor estensione, in associazione con la membrana plasmatica (Amenta et al., 2001). Tali risultati sono stati ottenuti lavorando sulle PBMC umane fresche e non stimolate. Da queste preparazioni la percentuale di cellule in cui sono state identificate le isoforme di VMAT sembra essere molto alta, sebbene non vengano fornite cifre a riguardo. Non sono stati effettuati studi di espressione genica o di funzionalità del trasportatore. Per tutti questi aspetti i dati dello studio di Amenta e collaboratori non sono conciliabili con i presenti risultati se non ipotizzando una aspecificità di quelle osservazioni, come sembra suggerire anche la diffusa positività osservata, che non ha riscontro nei nostri esperimenti.

In letteratura è presente un unico altro studio legato a cellule riconducibili al sistema immunitario, svolto da Watson et al., (1999) in cui è stata utilizzata una linea cellulare murina pre-B Ea3.123, con il fine di indagare l'importanza di VMAT2 nell'immagazzinamento di istamina nelle vescicole secretorie in queste

cellule. In tale modello, seppur relativamente distante dalle nostre cellule, è interessante notare un aumento dell'espressione genica del trasportatore sotto appropriati stimoli. Questo è stato riscontrato nel presente studio anche nei linfociti umani attivati e nelle relative sottopopolazioni linfocitarie rispetto alle medesime cellule non stimolate. Inoltre, per la particolare rilevanza del sistema istaminergico endogeno della linea cellulare in esame nello studio di Watson, è stata osservata un'attivazione trascrizionale del gene di VMAT2 in parallelo a quella dell'mRNA della L-istidina decarbossilasi (HDC) (Watson et al., 1999). Un aspetto analogo è stato rilevato da Cosentino et al., (2002), nei linfociti umani, osservando che l'espressione del principale enzima di sintesi delle CA, la tirosina idrossilasi (TH), poteva essere regolata in senso positivo a seconda degli stimoli utilizzati. Quanto affermato risulta coerente con l'ipotesi che vede una relazione tra l'aumento della produzione di catecolamine a seguito dell'attivazione trascrizionale degli enzimi chiave della sintesi e l'aumento di espressione del loro trasportatore, VMAT.

In aggiunta a questo aspetto, il trattamento con reserpina inibisce il trasportatore vescicolare delle monoamine, nei linfociti umani (come nelle cellule del sistema nervoso) ed è stato osservato, inoltre, che riduce l'accumulo intracellulare di CA che aumentano a livello extracellulare. Ciò ha, quindi, permesso di avvalorare l'ipotesi dell'esistenza di un sistema di immagazzinamento e di rilascio di CA anche nei linfociti (Marino et al., 1999).

Negli ultimi anni, sono stati accumulati diversi risultati circa la rilevanza funzionale della produzione endogena di CA nelle cellule del sistema immunitario. E' stato visto che nelle PBMC le CA, e in particolare la dopamina, possono indurre apoptosi e possono essere coinvolte nella modulazione funzionale del processo apoptotico stesso, attraverso un meccanismo regolatorio autocrino e paracrino. L'inibizione farmacologica della TH nelle PBMC in coltura stimolate con PHA riduce la percentuale di cellule apoptotiche e ciò porta a ritenere che le CA endogene abbiano una funzione modulatoria nei confronti delle cellule linfocitarie (Bergquist et al., 1994; Cioca et al., 2000; Jimenez Del Rio et al., 2000; Cosentino et al., 2002b; Cosentino et al., 2003). Cosentino et al (2007) mostra che la dopamina è in grado di inibire l'attività soppressoria dei linfociti

Treg responsabili della modulazione della proliferazione delle Teff contribuendo così al controllo dell'omeostasi immunitaria e al mantenimento della tolleranza immunologica (Sakaguchi et al., 1995). Attualmente si ritiene che la dopamina sia l'unico trasmettitore in grado di indurre effetti neuroprotettivi agendo sulla funzionalità delle Treg così come sulle loro proprietà adesive e migratorie, attraverso i recettori dopaminergici. Gli interferoni (IFN), di ruolo biologico e immunologico rilevante, sono stati identificati come molecole regolatrici della sintesi delle CA nelle PBMC umane (Cosentino et al. 2005). Quando le PBMC vengono stimulate con PHA, la produzione e il rilascio di CA vengono incrementate da IFN- β , se invece vengono stimulate con IFN- γ riducono persino l'espressione di mRNA della TH, ed infine la coincubazione dell'IFN- β con IFN- γ previene l'effetto inibitorio di quest'ultimo (Cosentino *et al.*, 2005) Gli IFN sembrano essere la prima componente fisiologica capace di modulare la produzione di CA da parte delle PBMC. L'azione dell'IFN- β sul rilascio delle CA è stato riscontrato nel presente studio sia nelle PBMC stimulate sia nella sottopopolazione linfocitaria CD4+ altamente purificata da colture di PBMC.

Ad oggi risulta ancora poco chiaro come agenti fisiologici e/o farmacologici siano in grado di modulare la risposta immunitaria attraverso un meccanismo CA-dipendente nei linfociti umani. Si rileva essere di grande importanza caratterizzare tale modulazione in quanto numerosi studi hanno consentito di ipotizzare il coinvolgimento di meccanismi autocrini/paracrini catecolaminergici in patologie autoimmuni, infiammatorie (quali la sclerosi multipla e l'artrite reumatoide) (Bellinger et al., 1992, Zoukos et al., 1994), neurodegenerative (come il Morbo di Parkinson), psichiatriche (quali schizofrenia e depressione) ed in patologie complesse causate da alterazioni a livello della trasmissione catecolaminergica.

I risultati di questo studio documentano la presenza di VMAT ed in particolare dell'isoforma 2 nei linfociti umani e nelle sottopopolazioni considerate (CD4⁺, CD8⁺). Sembra di conseguenza che il sistema catecolaminergico endogeno nei linfociti umani:

- sia un sistema diffuso nelle diverse sottopopolazioni e caratterizzato dalla capacità di essere regolato positivamente nel corso del processo di attivazione cellulare;

- possieda un'organizzazione subcellulare e molecolare simile a quella nota nel sistema nervoso centrale;
- possa essere modulato da diversi agenti fisiologici e/o farmacologici.

Nel sistema nervoso le diverse componenti delle vie catecolaminergiche (recettori, trasportatori, enzimi di sintesi e catabolismo) rappresentano dei bersagli preferenziali per farmaci molto importanti nella terapia medica di diverse patologie in molteplici campi della medicina (ad es., cardiovascolare, neurologico, neuropsichiatrico, come pure nella modulazione delle funzioni neurovegetative). Al contrario, questi meccanismi fino ad oggi sono stati ben poco studiati nella prospettiva di un loro utilizzo come modulatori della risposta immunitaria. Recenti evidenze indicano, tuttavia, come in numerose importanti patologie su base immunoinfiammatoria le vie catecolaminergiche siano coinvolte nei processi patogenetici e/o nelle risposte alle farmacoterapie (Cosentino et al., 2002b; Zaffaroni et al.; 2008; Capellino et al., 2010). La migliore conoscenza dell'organizzazione cellulare e molecolare e del ruolo fisiologico e funzionale di questi meccanismi è di conseguenza potenzialmente molto rilevante nella prospettiva di identificare approcci farmacoterapeutici innovativi per l'immunomodulazione in molteplici patologie di cruciale interesse clinico.

6 BIBLIOGRAFIA

- Aarons R.D., e Molinoff P.B. (1982) Changes in the density of beta adrenergic receptors in rat lymphocytes, heart and lung after chronic treatment with propranolol. *J Pharmacol Exp Ther* 221 (2): 439-443.
- Adem A, Nordberg A, e Slanina P. (1986) A muscarinic receptor type in human lymphocytes: a comparison of 3H-QNB binding to intact lymphocytes and lysed lymphocyte membranes. *Life Sci* 38(15): 1359-68.
- Alito A.E., Romeo H.E., Baler R., Chluyan H.E., Braun M., e Cardinali D.P. (1987) Autonomic nervous system regulation of murine immune responses as assessed by local surgical sympathetic and parasympathetic denervation. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 37: 305-319.
- Amenta F., Bronzetti E., Cantalamessa F., El-Assouad D., Felici L., Ricci A., e Tayebati S.K. (2001) Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 117; 133-142.
- Anlar B., Karaszewski J.W., Reder A.T., e Arnason B.G. (1992) Increased muscarinic cholinergic receptor density on CD4⁺lymphocytes in progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 36(2-3): 171-177.
- Arnason BG, Noronha AB and Reder AT (1988) Immunoregulation in rapidly progressive multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 540:4-12.
- Arzt E.S., Fernandez-Castelo S., Diaz A., Finkielman S., e Nahmod V.E. (1989) The muscarinic agonist pilocarpine inhibits DNA and interferon-gamma synthesis in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol* 11(3): 275-281.
- Audhya T., Jain R., e Hollander C.S. (1991) Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. *Cell Immunol* 134(1): 77-84.
- Baerwald C.G., Laufenberg M., Specht T., von Wichert P., Burmester G.R., e Krauser A. (1997) Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of beta 2-adrenergic receptors. *Br J Rheumatol* 36: 1262-1269.
- Baerwald CG, Wahle M, Ulrichs T, Jonas D, von Bierbrauer A, von Wichert P, Burmester GR, Krause A. Reduced catecholamine response of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 1999, 200: 77-91.
- Baigent S.M. (2001) Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22: 809-820.
- Bany U., Ryzewski J., e Maslinski W. (1999) Relative amounts of mRNA encoding four subtypes of muscarinic receptors (m2-m5) in human peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 97: 191-195.
- Barbanti P., Fabbri G., Ricci A., Cerbo R., Bronzetti E., Caronti B., Calderaro C., Felici L., Stocchi F., Meco G., Amenta F., e Lenzi G.L. (1999) Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease. *Mov Disord* 14(5): 764-771.
- Basu, Dasgupta (1999). Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J. Neuroimmunol.* 102, 113-124.
- Basu S., e Dasgupta P.S. (2000) Role of dopamine in malignant tumor growth. *Endocrine* 12(3): 237-241.
- Beck J., Rondot P., Catinot L., Falcoff E., Kirchner H., e Wietzerbin J. (1988) Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand* 78: 318-323.
- Bellinger D.L., Lorton D., Romano T., Olschowka J.A., Felten S.Y., e Felten D.L. (1990) Neuropeptide innervation of lymphoid organs. *Ann NY Acad Sci* 594: 17-33.
- Bellinger D.L., Lorton D., Felten S.Y., e Felten D.L. (1992) Innervation of lymphoid organs and implication in development, aging, and autoimmunity. *Int J Immunopharmacol* 14(3): 329-344.
- Bellinger D.L., Lorton D., Horn L., Brouxhon S., Felten S.Y., e Felten D.L. (1997) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of rat spleen, thymus, and lymph nodes. *Peptides* 18(8): 1139-1149.

- Benhammou K., Lee M., Strook M.A., Sullivan B., Logel J., Raschen K., Gotti C., e Leonard S. (2000) [³H]Nicotine binding in peripheral blood cells of smokers is correlated with the number of cigarettes smoked per day. *Neuropharmacol* 39: 2818-2829.
- Bergquist J., Tarkowski A., Ekman R., e Ewing A. (1994) Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci* 91: 12912-12916.
- Bergquist J., Josefsson E., Tarkowski A., Elkman R., e Ewing A. (1997) Measurements of catecholamine-mediated apoptosis of immunocompetent cells by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18: 1760-1766.
- Bergquist J., Josefsson E., Tarkowski A., e Ewing A. (1998) Measurements of catecholamine-mediated apoptosis of immunocompetent cells. *Immunol Today* 19: 562-567.
- Bergquist J., Tarkowski A., Ewing A., e Ekman R. (1998) Catecholaminergic suppression of immunocompetent cells. *Immunol Today* 19(12): 562-567.
- Bergquist J., Ohlsson B., e Tarkowski A. (2000) Nuclear factor-KB is involved in the catecholaminergic suppression of immunocompetent cells. *Ann Acad Sci New York* 917: 281-289.
- Berne-Fromell K., Fromell H., Lundkvist S., e Lundkvist P. (1987) Is multiple sclerosis the equivalent of Parkinson's disease for noradrenaline? *Med Hypotheses* 23(4): 409-415.
- Besedovsky H.O., e DelRey A. (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Rev* 17: 64-102.
- Besser M.J., Ganor Y., e Levite M. (2005) Dopamine by itself activates either D₂, D₃ or D₁/D₅ dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNF-alpha or both. *J Neuroimmunol* 169: 161-171.
- Bidart J.M., Assicot M., e Bohoun C. (1981) Catechol-o-methyl transferase activity in human mononuclear cells. *Res Commun Chem Pthol Pharmacol* 34(1): 47-54.
- Bidart J.M., Motte P.H., Assicot M., Bohoun C., e Belett D. (1983) Catechol-o-methyltransferasi activity and aminergic binding site distribution in human peripheral blood lymphocytes subpopulations. *Clin Immunol Immunopathol* 26: 1-9.
- Birtwistle, J., Baldwin, D (1998). Role of dopamine in schizophrenia and Parkinson's disease. *Br. J. Nurs.* 7, 832-834.
- Bissay V., De Klippel N., Herroelen L., Schmedding E., Buisseret T., Ebinger G., e De Keyser J. (1994) Bromocriptine therapy in multiple sclerosis: an open label pilot study. *Clin Neuropharmacol* 17(5): 473-6.
- Black P.H. (1994) Immune system-central nervous system interaction: effect and immunomodulatory consequences of immune system mediators on the brain. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 740-793.
- Blalock J.E. (1989) A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 69: 1-32.
- Boehmer V. H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology.* 6(4):338-44-.
- Bond P.A., e Cundall R.L. (1977) Properties of monoamine oxidase (MAO) in human blood platelets, plasma, lymphocytes and granulocytes. *Clin Chim Acta* 80 (2): 317-326.
- Borger P., Hoekstra Y., Esselink M.T., Postma D.S., Zaagsma J., Vellenga E., e Kauffman H.F. (1998) Beta-adrenoceptor-mediated inhibition of IFN-gamma, IL-3, and GM-CSF mRNA accumulation in activated human T lymphocytes is solely mediated by the beta2-adrenoceptor subtype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 400-407.
- Bortkiewicz H., e Ryzewski J. (1989) Factor released from human lymphocytes stimulated cholinergically *in vitro*: an E-rosetting inhibitor. *Int J Tissue React* 11: 101-106.
- Brown SW, Meyers RT, Brennan KM, Rumble JM, Narasimhachari N, Perozzi EF, Ryan JJ, Stewart JK, Fischer-Stenger K. (2003) Catecholamines in a macrophage cell line. *J Neuroimmunol* 135(1-2):47-55.
- Bruder D., Probst-Kepper M., Westendorf A.M., Geffers R., Beissert S., Loser K., von Boehmer H., Buer J., e Hansen W. (2004) Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34(5): 623-630.

- Bryant M.C., Polak J.M., Modlin I., Bloom S.R., Albuquerque R.H., e Pearse A.G.E. (1976) Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. *Lancet* 1: 991.
- Buckner (2010) Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology* 10, 849-859
- Bulloch K., e Moore R.Y. (1980) Nucleus ambiguus projections to the thymus gland: possible pathways for regulation of the immune response and the neuroendocrine network. *Anat Record* 196: 25a.
- Bulloch K., e Pomerantz W. (1984) Autonomic nervous system innervation of thymic-related lymphoid tissue in wildtype and nude mice. *J Comp Neurol* 228: 57-68.
- Bylund D.B., Bond R.A., Clarke D.E., Eikenburg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.B., Ruffolo R.R., Strosberg A.D., e Trendelenburg U.G. (1998) Adrenoceptor In: *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*.
- Calvo J.R., Pozo D., e Guerrero J.M. (1996) Functional and molecular characterization of VIP receptors and signal transduction in human and rodent immune systems. *Adv Neuroimmunol.* 6(1): 39-47.
- Campbell Daniel J. and Koch Meghan A. (2011) Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology* 11, 119-130
- Cannon W.B., e Uridil J.E. (1921) Studies on the condition of activity in endocrine glands. VIII. Some effects on the denervated heart of stimulating the nerves of the liver. *Am J Physiol* 58: 353-354.
- Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, et al. CD25brightCD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R335e46.
- Capellino S, Cosentino M, Wolff C, Schmidt M, Grifka J, Straub RH. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Ann. Rheum. Dis.* 2010, 69: 1853-1860.
- Caronti B., Tanda G, Colosimo C., Ruggieri S., Calderaro C., Palladini G, Pontieri F.E., e Di Chiara G. (1999) Reduced dopamine in peripheral blood lymphocytes in Parkinson's disease. *Neuroreport* 10(14): 2907-2910.
- Caronti B., Antonini G., Calderaro C., Ruggieri S., Palladini G., Pontieri F.E., e Colosimo C. (2001) Dopamine transporter immunoreactivity in peripheral blood lymphocytes in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 108: 803-807.
- Casale T.B., e Kaliner M. (1984) Demonstration that circulating human blood cells have no detectable α 1-adrenergic receptors by radioligand binding analysis. *J Allergy Clin Immunol* 74: 812-818.
- Cauli O., e Morelli M. (2005) Caffeine and the dopaminergic system. *Behav Pharmacol* 16(2): 63-77.
- Chakraborty S., Mehrotra S., Chhabra A., e Mukherji B. (2004) Regulatory T-cell response and tumor vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes in human melanoma. *Hum Immunol* 65: 794-802.
- Chambers D.A., e Schauenstein K. (2000) Mindful immunology: neuroimmunomodulation. *Immunol Today* 21(4): 168.
- Chelmicka-Schorr E., Kwasniewski M.N., e Czlonkowska A. (1992a) Sympathetic nervous system odulates macrophage function. *Int J Immunopharmac* 14: 841-846.
- Chelmicka-Schorr E., Wasniewski M.N.K., e Wollmann R.L. (1992b) Sympathectomy augments adoptively transferred experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 37: 99-103.
- Chelmicka-Schorr E., e Arnason B.G.W. (1994) Nervous system-immune system interactions and their role in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36: S29-S32.
- Chelmicka-Schorr E., e Arnason B.G.W. (1999) Interactions between the sympathetic nervous system and the immune system. *Brain Behav Immun* 13: 271-278.
- Chen Y., Kuchroo V.K., Inobe J., Hafler D.A., e Weiner H.L. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265: 1237-1240.

- Chrousos GP (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332:1351–1362.
- Cioca DP, Watanabe N, Isobe M. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes is induced by catecholamines. *Jpn Heart J*. 2000 May;41(3):385-98.
- Clarke B.L., e Bost K.L. (1989) Differential expression of functional adrenocorticotrophic hormone receptors by subpopulations of lymphocytes. *J Immunol* 143(2): 464-9.
- Comi C., Leone M., Bonisconi S., DeFranco S., Bottarel F., Mezzatesta C., Chiocchetti A., Perla F., Monaco F., e Dianzani U. (2000) Defective T cell Fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 55: 921-927.
- Cosentino M., Bombelli R., Ferrari M., Marino F., Rasini E., Maestroni G.J.M., Conti A., Boveri M., Lecchini S., e Frigo G. (2000) HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life Science* 68: 283-295.
- Cosentino M., Marino F., Bombelli R., Ferrari M., Rasini E., Lecchini S., e Frigo G. (2002a) Stimulation with phytohaemagglutinin induces the synthesis of catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells: role of protein kinase C and contribution of intracellular calcium. *J Neuroimmunol* 125: 125-133.
- Cosentino M., Zaffaroni M., Marino F., Bombelli R., Ferrari M., Rasini E., Lecchini S., Grezzi A., e Frigo G. (2002b) Catecholamine production and tyrosine hydroxylase expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients: effect of cell stimulation and possibile relevance for activation-induced apoptosis. *J Neuroimmunol* 133(1-2): 233-240.
- Cosentino M., Marino F., Bombelli R., Ferrari M., Lecchini S., e Frigo G. (2003) Unravelling dopamine (and catecholamine) physiopharmacology in lymphocytes: open questions. *TRENDS Immunol* 24(11): 581-582.
- Cosentino M, Rasini E, Colombo C, Marino F, Blandini F, Ferrari M, Samuele A, Lecchini S, Nappi G, Frigo G. (2004) Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: evidence for a D1-like receptor-dependent protective effect. *Free Radic. Biol. Med.* 36:1233-40).
- Cosentino M., Zaffaroni M., Ferrari M., Marino F., Bombelli R., Rasini E., Frigo G., Ghezzi A., Comi G., e Lecchini S. (2005) Interferon-gamma and interferon-beta affect endogenous catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 162(1-2): 112-121.
- Cristina C., Garcia-Tornadu I., Diaz-Torga G., Rubinstein M., Low M.J., e Becu-Villalobos D. (2006) Dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma. *Front Horm Res* 35:50-63.
- Dejaco C., Duftner C., Grubeck-Loebenstien B., e Schirmer M. (2006) Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunol* 117: 289-300.
- Diebold S.S., Montoya M., Unger H., Alexopoulou L., Roy P., Haswell L.E., Al-Shamkhani A., Flavell R., Borrow P., e Reis e Sousa C. (2003) Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424: 324-328.
- Dijkstra C.D., van der Voort E.R., De Groot C.J., Huitinga I., Uitdehaag B.M., Polman C.H., e Berkenbosch F. (1994) Therapeutic effect of the D₂-dopamine agonist bromocriptine on acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Psychoneuroendocrinol* 19(2): 135-42.
- Edgar V.A., Cremaschi G.A., Sterin-Borda L., e Genaro A.M. (2002) Altered expression of autonomic neurotransmitter receptors and proliferative responses in lymphocytes from a chronic mild stress model of depression: effects of fluoxetine. *Brain Behav Immun* 16: 333-350.
- Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004;200:277e85
- Elenkov I.J., Wilder R.L., Chrousos G.P., e Vizi E.S. (2000) The sympathetic Nerve-An integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52: 595-638.

- Erickson J.D., Schafer M.K.H., Bonner T.I., Eiden L.E., e Weile E. (1996) Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Neurobiol* 93: 5166-5171.
- Faraj B.A., Olkowski L.Z., e Jackson R.T. (1991) Binding of [³H]-Dopamine to Human Lymphocytes: Possible Relationship to Neurotransmitter Uptake Sites. *Pharmacology* 42: 135-141.
- Faraj B.A., Olkowski Z.L., e Jackson R.T. (1994) Active [3H]-dopamine uptake by human lymphocytes: correlates with serotonin transporter activity. *Pharmacology* 48: 320-327.
- Faraj B.A., Olkowski Z.L., e Jackson R.T. (1995) A cocaine-sensitive active dopamine transport in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 50(7): 1007-1014.
- Feger U., Luther C., Poeschel S., Melms A., Tolosa E., e Wiendl H. (2007) Increased frequency of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 147(3): 412-8.
- Fehervari Z., e Sakaguchi S. (2004) CD4⁺ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 114(9): 1209-17.
- Fehervari Z., e Sakaguchi S. (2004) Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 16(2): 203-238.
- Fehervari Z., e Sakaguchi S. (2004) A paragon of self-tolerance: CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res Ther* 6(1): 19-25.
- Felten S.Y., e Felten D.I. (1990) The innervation of lymphoid organs. In *Psychoneuroimmunology II* (eds Ader, R., Felten D.L. and Cohen N.), Academic Press, New York 2: 27-69.
- Ferrari M., Cosentino M., Marino F., Bombelli R., Rasini E., Lecchini S., e Frigo G. (2004) Dopaminergic D₁-like receptor-dependent inhibition of tyrosine hydroxylase mRNA expression and catecholamine production in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 67(5): 865-73.
- Ferrero P., Rocca P., Eva C., Benna P., Rebaudengo N., Ravizza L., Genazzani E., e Bergamasco B. (1991) An analysis of lymphocyte ³H-N-Methyl-scopolamine binding in neurological patients. *Brain* 114: 1759-1770.
- FitzGerald G.B., e Wick M.M. (1983) 3,4-Dihydroxybenzylamine: an improved dopamine analog cytotoxic for melanoma cells in part through oxidation products inhibitory to dna polymerase. *J Invest Dermatol* 80: 119-123.
- Flierl, Rittirsch, Lang, Sarma, Ward (2007). Catecholamines crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening Pandora's box? *Mol Med* 14, 195-204.
- Fontenot J.D., Gavin M.A., e Rudensky A.Y. (2003) FoxP3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336.
- Fontenot J. D. Rudensky A.Y. 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory t cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunology*. 6(4):331-7.
- Fontenot J. D. Rasmussen J. P. Williams L.M. Dooley J. L. Farr A. G. and Rudensky A.Y. 2005b. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 22(3): 329-41.
- Friedman E.M., e Irwin M.R. (1997) Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. *Pharmacol Ther* 74(1): 27-38.
- Fujino H., Kitamura Y., Yada T., Uehara T., e Nomura Y. (1997) Stimulatory roles of muscarinic acetylcholine receptors on T cell antigen receptor/CD3 complex-mediated interleukin-2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Mol Pharmacol* 51: 1007-1014.
- Gambineri E., Torgerson T.R., e Ochs H.D. (2003) Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15(4): 430-435.
- Gavin M.A., Clarke S.R., Negrou E., Gallegos A., e Rudensky A. (2002) Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells *in vivo*. *Nat Immunol* 3(1): 33-41.

- Geenen R., Godaert G.L., Jacobs J.W., Peters M.L., e Bijlsma J.W. (1996) Diminished autonomic nervous system responsiveness in rheumatoid arthritis of recent onset. *J Rheumatol* 23: 258-264.
- Gershon R.K., e Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18: 723-735.
- Gershon RK, Choen P, Hencin R, et al. Suppressor T cells. *J Immunol* 1972;108:586-90.
- Gershon RK. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev* 1975;26:170-85.
- Ghosh M.C., Mondal A.C., Basu S., Banerjee S., Majumder J., Bhattacharya D., e Dasgupta P.S. (2003) Dopamine inhibits cytokine release and expression of tyrosine kinases, Lck and Fyn in activated T cells. *Int Immunopharmacol* 3: 1019-1026.
- Gielen A., Khademi M., Muhallab S., Olsson T., e Piehl F. (2003) Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Scand J Immunol* 57(5): 493-7.
- Gilbert M.S., e Payan D.G. (1991) Interaction between the nervous and immune system. *Front Neuroendocrinol* 12: 299-322.
- Giorelli M., Livrea P., e Trojano M. (2005) Dopamine fails to regulate activation of peripheral blood lymphocytes from multiple sclerosis patients: effects of IFN- γ . *J Interferon Cytokine Res* 25(7): 395-406.
- Goetzl E.J., Pankhaniya R.R., Gaufo G.O., Mu Y., Xia M., e Sreedharan S.P. (1998) Selectivity of effects of vasoactive intestinal peptide on macrophages and lymphocytes in compartmental immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 840: 540-550.
- Gray C.P., Arosio P., e Hersey P. (2003) Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4+CD25+ regulatory T-cell levels in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 9(7): 2551-2559.
- Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries JE., e Roncarolo M.G. (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389: 737-742.
- Guillot TS, Miller GW. (2009) Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons.
- Haas J., Hug A., Viehover A., Fritzsching B., Falk C.S., Filser A., Vetter T., Milkova L., Korporal M., Fritz B., Storch-Hagenlocher B., Krammer P.H., Suri-Payer E., e Wildemann B. (2005) Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35(11): 3343-3352.
- Hammarberg H., Lidman O., Lundberg C., Eltayeb S.Y., Gielen A.W., Muhallab S., Svenningsson A., Linda H., van Der Meide P.H., Cullheim S., Olsson T., e Piehl F. (2000) Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci* 20(14): 5283-91.
- Hassner A., Lau M.S., Goetzl E.J., e Adelman D.C. (1993) Isotype-specific regulation of human lymphocyte production of immunoglobulins by sustained exposure to vasoactive intestinal peptide. *J Allergy Clin Immunol* 92: 891-901.
- Hauben E., Butovsky O., Nevo U., Yoles E., Moalem G., Agranov E., Mor F., Leibowitz-Amit R., Pevsner E., Akselrod S., Neeman M., Cohen I.R., e Schwartz M. (2000) Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci* 20(17): 6421-6430.
- Haycock J.W., Browning M.D., e Greengard P. (1988) Cholinergic regulation of protein phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1677-1681.
- Heijnen C.J., e Rouppe van der Voort C. (1996) Functional α -1 adrenoreceptors on leukocytes of patient with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Neuroimmunol* 71: 223-226.
- Henry J.P., Gasnier B., Roisin M.P., Isambert M.F., e Scherman D. (1987) Molecular pharmacology of the monoamine transporter of the chromaffin granule membrane. *Ann N Y Acad Sci* 493: 194-206.
- Henry JP, Sagné C, Bedet C, Gasnier B. (1998) The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain.
- Hickey W.F., Hsu B.L., e Kimura H. (1991) T lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28: 254-260.

- Hiura T., Kagamu H., Miura S., Ishida A., Tanaka H., Tanaka J., Gejyo F., e Yoshizawa H. (2005) Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression. *J Immunol* 175: 5058-5066.
- Hodel A. (2001) Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol* 13: 217-221.
- Holtz P. (1950) Ueber die sympathicomimetische Wirksamkeit von Gehirnexttrakten. *Acta Physiol Scand* 20: 354-362.
- Hong J., Li N., Zhang X., Zheng B., e Zhang J.Z. (2005) Induction of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor FoxP3. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 6449-6454.
- Hohnoki K., Inoue A., e Koh C.S. (1998) Elevated serum levels of IFN- γ , IL-4 and TNF-alpha/unelevated serum levels of IL-10 in patients with demyelinating diseases during the acute stage. *J Neuroimmunol* 87: 27-32.
- Holz R.W., Senter R.A., e Frye R.A. (1982) Relationship between Ca²⁺ uptake and catecholamine secretion in primary dissociated cultures of adrenal medulla. *J Neurochem* 39(3): 635-646.
- Hori S., Nomura T., e Sakaguchi S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. *Science* 299: 1057-1061.
- Huan J., Culbertson N., Spencer L., Bartholomew R., Burrows G.G., Chou Y.K., Bourdette D., Ziegler S.F., Offner H., e Vandenbark A.A. (2005) Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 81(1): 45-52.
- Ilani T., Ben-Shachar D., Strous R.D., Mazor M., Sheinkman A., Kotler M., e Fuchs S. (2001) a peripheral marker for schizophrenia: increased levels of D₂ dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes. *PNAS* 98(2): 625-628.
- Ilani T., Strous R.D., e Fuchs S. (2004) Dopaminergic regulation of immune cells via D₂ dopamine receptor: a pathway mediated by activated T cells. *FASEB J* 18: 1600-1602.
- Javla L.R., e Rosenberg S.A. (2003) CD4⁺CD25⁺ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother* 26: 85-93.
- Jetschmann J.U., Benschop R.J., Jacobs R., Kemper A., Oberbeck R., Schmidt R.E., e Schedlowski M. (1997) Expression and in-vivo modulation of alpha- and beta- adrenoreceptors on human natural killer (CD16+) cells. *J Neuroimmunol* 74: 159-164.
- Jiang H, e Chess L. (2006) Regulation of immune responses by T cells. *New Engl J Med* 354(11): 1166-1176.
- Jimenez Del Rio M., e Velez-Pardo C. (2000) 17 β -estradiol protects lymphocytes against dopamine and iron-induced apoptosis by a genomic-independent mechanism. Implication in Parkinson's disease. *Gen Pharmacol* 35: 1-9.
- Johnson H.M., Smith E.M., Torres B.A., e Blalock J.E. (1982) Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4171-4.
- Johnson H.M., e Torres B.A. (1994) Complementary peptides as probes to explore neuropeptide receptors on lymphocytes. *Immunomethods* 5(2): 167-71.
- Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, et al. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001;193:1285e 94.
- Josefsson E., Bergquist J., Ekman R., e Tarkowski A. (1996) Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology* 88: 140-146.
- Junker A et al, 2007. Multiple Sclerosis: T-cell receptor expression indistinct brain regions. *Brain*.
- Kadowaki N., e Liu Y.J. (2002) Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 63: 1126-1132.
- Kamp T, Liebl B, Haen E, Emmerich B, Hallek M (1997) Defects of beta 2-adrenergic signal transduction in chronic lymphocytic leukaemia: relationship to disease progression. *Eur J Clin Invest* 27:121.
- Kanner B.I., Fishkes H., Maron R., Sharon B., e Schuldiner S. (1979) Reserpine as a competitive and reversible inhibitor of the catecholamine transporter of bovine chromaffin granules. *FEBS Lett* 100: 175-180.

- Karim M., Kingsley C.I., Bushell A.R., Sawitzki B.S., e Wood K.J. (2004) Alloantigen-induced CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells can develop *in vivo* from CD25⁺CD4⁺ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 172(2): 923-8.
- Kavelaars A., Rouppe van der Voort C., e Heijnen C. (1999) Adrenergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. *Hypertension* 34(5):e5.
- Kawashima K., Fujii T., Watanabe Y., e Misaka H. (1998) Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-lymphocytes. *Life Science* 62(17/18): 1701-1705.
- Kawashima K., e Fujii T. (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol & Ther* 86: 29-48.
- Kawashima K., e Fujii T. (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Science* 74: 675-696.
- Kawashima K., e Fujii T. (2003) The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sciences* 72: 2101-2109.
- Keegan B.M., e Noseworthy J.H. (2002) Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53: 285-302.
- Kendall M.D., e al-Shawaf A.A. (1991) Innervation of the rat thymus gland. *Brain Behav Immunol* 5: 9-28.
- Kempainen R.J., e Behrend E.N. (1997) Adrenal physiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27(2): 173-186.
- Khan M.M., Sansoni P., Silverman E.D., Engleman E.G., e Melmon K.L. (1986) Beta-adrenergic receptors on human suppressor, helper, and cytolytic lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 35: 1137-42.
- Khattri R., Cox T., Yasayko S.A., e Ramsdell F. (2003) An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-342.
- Kilpatrick D.L., Slepatis R.J., Corcoran J.J., e Kirshner N. (1982) Calcium uptake and catecholamine secretion by cultured bovine adrenal medulla cells. *J Neurochem* 38: 427-435.
- Kipnis J., Mizrahi T., Hauben E., Shaked I., Shevach E., e Schwartz M. (2002) Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(24): 15620-15625.
- Kipnis J., Avidan H., Caspi R.R., e Schwartz M. (2004) Dual effect of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in neurodegeneration: a dialogue with microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(Suppl2): 14663-14669.
- Kipnis J., Cardon M., Avidan H., Lewitus G.M., Mordechay S., Rolls A., Shani Y., e Schwartz M. (2004) Dopamine, through the extracellular signal-regulated kinase pathway, downregulates CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell activity: implications for neurodegeneration. *J Neurosci* 24(27): 6133-6143.
- Kirshner, N. (1962) Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla. *J. Biol. Chem.* 237, 2311-2317
- Knuutila S., e Kovanen P.E. (1987) Relative proportions of mitotic T and B cells in PHA-stimulated lymphocyte cultures. *Cancer Genet Cytogenet* 29(1): 151-154.
- Kohm A.P., e Sanders V.M. (2000) Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. *Immunol Today* 21(11): 539.
- Koopman FA, Stoof SP, Straub RH, Van Maanen MA, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis. *Mol. Med.* 2011 May 20. doi: 10.2119/molmed.2011.00065.
- Korn, T. *et al.* Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature Med.* **13**, 423–431 (2007).
- Kovanem P.E., e Knuutila S. (1989) Mitotic cells in different lymphocyte subsets in unfractionated cultures stimulated by phytohaemagglutinin or pokeweed mitogen. *Ereditas* 110(1): 69-74.
- Kurtzke J.F. (1983) Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444-1452.

- Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey E. A. 2006. Thimic microenvironments for t cell differentiation and selection. *Nature immunology*. 7(4):338-43.
- Lai J.-P., Douglas S.D., e Ho W.-Z. (1998) Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmun* 86(1): 80-6.
- Lal G, Bromberg JS. 2009. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*.114(18):3727-35
- Lakshmi C., Deb C., Ray C., e Ray M.R. (2005) Reduction of hematotoxicity and augmentation of antitumor efficacy of cyclophosphamide by dopamine. *Neoplasma* 52(1): 68-73.
- Lan R.Y., Ansari A.A., Lian Z.X., e Gershwin M.E. (2005) Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 4: 351-363.
- Langrish CL et al, 2005. IL23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Ex Med*.
- Lassmann H. (2004) Recent neuropathological findings in MS-implications for diagnosis and therapy. *J Neurol Suppl* 4: IV2-5.
- Lennon V.A. (1976) Immunology of the acetylcholine receptor. *Immunol Commun* 5(4): 323-344.
- Levite M., Chowers Y., Ganor Y., Besser M., Hershkovits R., e Cahalon L. (2001) Dopamine interacts directly with its D₃ and D₂ receptors on normal human T cells, and activates beta₁ integrin function. *Eur J Immunol* 31(12): 3504-3512.
- Levite M. (2001) Nervous immunity: neurotransmitters, extracellular K⁺ and T-cell function. *Trends Immunol* 22: 2-5.
- Liu Y., e Edwards R.H. (1997) The role of vesicular transport protein in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 20: 125-156.
- Livnat S., Madden K.S., Felten D.L., e Felten S.Y. (1986) Regulation of the immune system by sympathetic neural mechanisms. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 11: 145-152.
- Lock C et al, 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*.
- Loder C., Allawi J., e Horrobin D.F. (2002) Treatment of multiple sclerosis with lofepramine, L-phenylalanine and vitamin B(12): mechanism of action and clinical importance: roles of the locus coeruleus and central noradrenergic systems. *Med Hypotheses* 59(5): 594-602.
- Loeper M, Crouzon O (1904) L'action de l'adrénaline sur le sang. *Arch Med Exp Anat Path* 18: 83-108
- Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JW, Okihara KL, Van de Pol M, Ochsmann S, Pawlak C, Schmidt RE, Heijnen CJ. Decreased expression and activity of G-proteincoupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J*. 1999, 13: 715-725.
- Lucchinetti A.C., Bruck W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., e Lassmann H. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implication for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47(6): 707-717.
- Macchi B., Matteucci C., Nocentini U., Caltagirone C., e Mastino A. (1999) Impaired apoptosis in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *NeuroReport* 10: 399-402.
- Maestroni G.J.M., e Conti A. (1994) Noradrenergic modulation of lymphohematopoiesis. *Int J Immunopharmacol* 16: 117-122.
- Maestroni G.J.M. (2000) Dendritic cell migration controlled by α_{1b} -adrenergic receptors. *J Immunol* 165: 6743-6747.
- Makhlouf K., Weiner H.L., e Khoury S.J. (2002) Potential of β_2 -adrenoceptor agonists as add-on therapy for multiple sclerosis. Focus on salbutamol (albuterol). *Drugs* 16: 1-8.
- Maki T, Andersson LC, e Kontula KK. (1992) Expression and function of beta-adrenergic receptors in human hematopoietic cell lines. *Eur J Haematol* 49(5): 263-268.
- Malek T.R., Yu A., Vincek V., Scibelli P., e Kong L. (2002) CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17(2): 167-178.

- Mallet J. (1996) Catecholamines: from gene regulation to neuropsychiatric disorders. *TiPS* 17: 129-135.
- Marino F., Cosentino M., Bombelli R., Ferrari M., Lecchini S., e Frigo G. (1999) Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol* 27: 489-495.
- Martin R., Gran B., Zhao Y., Markovic-Plese S., Bielekova B., Marques A., Sung M.H., Hemmer B., Simon R., McFarland H.F., e Pinilla C. (2001) Molecular mimicry and antigen-specific T cell responses in multiple sclerosis and chronic CNS Lyme disease. *J Autoimmun* 16: 187-192.
- Maslinski W., Kullberg M., Nordstrom O., e Bartfai T. (1988) Muscarinic receptors and receptor-mediated actions on rat thymocytes. *J Neuroimmunol* 17: 265-274.
- Maslinski W. (1989) Cholinergic receptors of lymphocytes. *Brain Behav Immun* 3(1): 1-14.
- Masson J., Sagnè C., Hamon M., e Mestikavy S.E.L. (1999) Neurotransmitter trasporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51(3): 439-464.
- Masturzo P., Salmona M., Nordstrom O., Consolo S., e Ladinsky H. (1985) Intact human lymphocyte emmbranes respond to muscarinic receptor stimulation by oxotremorine with marked changes in microviscosity and an increase in cyclic GMP. *FEBS Lett* 192(2): 194-198.
- McFarlin DE, Mc Farland HF, 1982. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.*
- McHugh R.S., Whitters M.J., Piccirillo C.A., Young D.A., Shevach E.M., Collins M., e Byrne M.C. (2002) CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16(2): 311-323.
- McHugh R.S., Shevach E.M., Margulies D.H., e Natarajan K. (2001) A T cell receptor transgenic model of severe, spontaneous organ-specific autoimmunity. *Eur J Immunol* 31(7): 2094-2103.
- McKenna F., McLaughlin P.J., Lewis B.J., Sibbring G.C., Cummerson J.A., Bowen-Jones D., e Moots R.J. (2002) Dopamine receptor expression on human T- and B-Lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol* 132(1-2): 34-40.
- McMurray R.W. (2001) Prolactin in murine systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10(10): 742-747.
- Mentlein R., e Kendall M.D. (2000) The brain and thymus have much in common: a functional analysis of their microenvironments. *Immunol Today* 21(3): 133.
- Mill J., Asherson P., Browes C., D'Souza U., e Craig I. (2002) Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3 UTR VNTR: evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet* 114(8): 975-979.
- Miller R.A. (1996) Calcium signals in T lymphocytes from old mice. *Life Sci* 59(5-6): 469-475.
- Miller L.E., Justen H.-P., Scholmerich J., e Straub R.H. (2000) The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patient with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinaphrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 14: 2097-2107
- Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J.* 2000, 14: 2097-2107.
- Miller LE, Grifka J, Schölmerich J, Straub RH. Norepinephrine from synovial tyrosine hydroxylase positive cells is a strong indicator of synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2002, 29: 427-435.
- Mills K.H. (2004) Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4(11): 841-55.
- Moalem G., Monsonogo A., Shani Y., Cohen I.R., e Schwartz M. (1999) Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. *FASEB J* 13(10): 1207-1217.
- Moalem G., Leibowitz-Amit R., Yoles E., Mor F., Cohen I.R., e Schwartz M. (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5(1): 49-55.

- Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, et al. CD25 β cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1452e60.
- Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25 β regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 2005;52:2212e21.
- Moschos S., Varanasi S., e Kirkwood J.M. (2005) Interferons in the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Res* 126: 207-241.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.*1;136(7):2348-57.
- Mosmann TR, Sad S. 1996 The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*;17(3):138-46.
- Motulsky H.J., e Insel P.A. (1982) Adrenergic receptors in man: direct identification, physiologic regulation and clinical alterations. *N Engl J Med* 307(1): 18-29.
- Musso N.R., Brenci S., e Setti M. (1996) Catecholamine content and in vitro catecholamine synthesis in peripheral human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 81(10): 3553-3557.
- Musso N.R., Brenci S., Indiveri F., e Lotti G. (1997) L-Tyrosine and nicotine induce synthesis of L-DOPA and norepinephrine in human lymphocytes. *J Neuroimmunol* 74: 117-120.
- Musso N.R., Brenci S., Indiveri F., e Lotti G. (1998) Acetylcholine-induced, calcium-dependent norepinephrine outflow from peripheral human lymphocytes. *J Neuroimmunol* 87: 82-87.
- Nakamura K., Kitani A., e Strober W. (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194(5): 629-644.
- Neumann H et al, 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS disease. *Trends Neurosci*.
- Nguyen LT, Jacobs J, Mathis D, et al. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:509e20.
- O'Connor K.C., Bar-Or A., e Hafler D.A. (2001) The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 21: 81-92.
- Okuma Y., e Nomura Y. (2001) Roles of Muscarinic Acetylcholine Receptors in Interleukin-2 Synthesis in Lymphocytes. *Jpn J Pharmacol* 85: 16-19.
- Olsson T., Zhi W.W., Hojeberg B., Kostulas V., Jiang Y.P., Anderson G., Ekre H.P., e Link H. (1990) Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *J Clin Invest* 86: 981-985.
- Panina-Bordignon P., Mazzeo D., Lucia P.D., D'Ambrosio D., Lang R., Fabbri L., Self C., e Sinigaglia F. (1997) Beta2-agonists prevent Th 1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest* 100: 1513-1519.
- Pawlikowski M. (1999) Endocrine/paracrine control of pituitary cell proliferation and its involvement in pituitary tumorigenesis. *Pituitary* 1(3-4): 251-256.
- Payan D.G., Brewster D.R., Missirian-Bastian A., e Goetzi E.J. (1984a) Substance P recognition by a subset of human T lymphocytes. *J Clin Invest* 74(4): 1532-9.
- Payan D.G., Levine J.D., e Goetzi J. (1984b) Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J Immunol* 132: 1601.
- Pender M.P. (1998) Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis. *Lancet* 351: 978-981.
- Perrin M.H., e Vale W.W. (1999) Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 885: 312-28.
- Peterson C. (1992) Changes in calcium's role as a messenger during aging in neuronal and nonneuronal cells. *Ann N Y Acad Sci* 663: 279-293.

- Petitto J.M., Huang Z., e McCarthy D.B. (1994) Molecular cloning of NPY-Y1 receptor cDNA from rat splenic lymphocytes: evidence of low levels of mRNA expression and [125I]NPY binding sites. *J Neuroimmunol* 54(1-2): 81-86.
- Phillips JH. Transport of catecholamines by resealed chromaffin-granule "ghosts". *Biochem J.* 1974 Nov;144(2):311-8.
- Pothos EN, Larsen KE, Krantz DE, Liu Y, Haycock JW, Setlik W (2000) Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *J Neurosci* 20:7297-7306.
- Piccirillo C.A., Letterio J.J., Thornton A.M., McHugh R.S, Mamura M., Mizuhara H., e Shevach E.M. (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196: 237-246.
- Piccirillo C.A., e Thornton A.M. (2004) Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol* 25: 374-380.
- Powrie F., Mauze S., e Coffman R.L. (1997) CD4+ T cells in the regulation of inflammatory responses in the intestine. *Res Immunol* 148: 576-581.
- Putheti P., Soderstrom M., Link H., e Huang Y.M. (2003) Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144(1-2): 125-131.
- Qiu Y., Peng Y., e Wang J. (1996) Immunoregulatory role of neurotransmitter. *Adv Neuroimmunol* 6: 223-231.
- Qiu YH, Cheng C, Dai L, Peng YP. (2005) Effect of endogenous catecholamines in lymphocytes on lymphocyte function. *J Neuroimmunol*;167(1-2):45-52.
- Rabey J.M., Shenkman L., e Gilad G.M. (1986) Cholinergic muscarinic binding by human lymphocytes: changes with aging, antagonist treatment, and senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 20(5): 628-631.
- Rajda C., Bencsik K., Vecsei L., e Bergquist J. (2002) Catecholamine levels in peripheral blood lymphocytes from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 124: 93-100.
- Ramsdell F., e Ziegler S.F. (2003) Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 15(6): 718-724.
- Read S., Malmstrom V., e Powrie F. (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192: 295-302.
- Reguzzoni M., Cosentino M., Rasini E., Marino F., Ferrari M., Bombelli R., Congiu T., Pratasoni M., Quacci D., Lecchini S., Raspanti M., e Frigo G. (2002) Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in human peripheral blood mononuclear cells: effect of stimulation with phytohaemagglutinin. *Cell Tissue Res* 310(3): 297-304.
- Revel M. (2003) Interferon-beta in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 100: 49-62.
- Ricci A., Bronzetti E., Felici L., Tayebati S.K., e Amenta F. (1997) Dopamine D₄ receptor in human peripheral blood lymphocytes: a radioligand binding assay study. *Neurosci Lett* 229: 130-134.
- Ricci A., Bronzetti E., Mignini F., Khosrow Tayebati S., Zaccheo D., e Amenta F. (1999) Dopamine D₁-like receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 96: 234-240.
- Richman D.P., Antel J.P., Burns J.B., e Arnason B.G. (1981) Nicotinic acetylcholine receptor on human lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 377: 427-435.
- Rieckmann P., Albrecht M., Kitzte B., Weber T., Tumani H., Broocks A., Luer W., e Poser S. (1994) Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 44: 1523-1526.
- Rinner I., Felner P., Falus A., Skreiner E., Kukulansky T., Globerson A., Hirokawa K., e Schauenstein K. (1995) Cholinergic signals to and from the immune system. *Immunol Lett* 44: 217-220.
- Rogers MP and Fozdar M (1996) Psychoneuroimmunology of autoimmune disorders. *Adv Neuroimmunol* 6:169-177.
- Roupe van der Voort C, Kavelaars A, van de Pol M, e Heijnen CJ. (1999) Neuroendocrine mediators up-regulate alpha1b- and alpha1d-adrenergic receptor subtypes in human monocytes. *J Neuroimmunol* 95(1-2): 165-73.

- Roupe van der Voort C., Kavelaars A., Van de Pol M., e Heijnen C.J. (2000) Noradrenaline induces phosphorylation of ERK-2 in human peripheral blood mononuclear cells after induction of α 1-adrenergic receptors. *J Neuroimmunol* 108: 82-91.
- Saha B., Mondal A.C., Majumder J., Basu S., e Dasgupta P.S. (2001) Physiological concentration of dopamine inhibit the proliferation and cytotoxicity of human CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro*: a receptor-mediated mechanism. *Neuroimmunomodulation* 9: 23-33.
- Said S.I. (1980) Vasoactive intestinal peptide (VIP): isolation, distribution, biological actions, structure-function relationships, and possible function. In *Gastrointestinal hormones*. Edited by G.B.J.Glass. Raven Press, New York.
- Sakaguchi S., Fukuma K., Kuribayashi K., e Masuda T. (1985) Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161: 72-87.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., e Toda M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3): 1151-1164.
- Sakaguchi S. (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunological self-tolerance. *Cell* 101: 455-458.
- Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review Of Immunology*. 22: 531-62
- Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. 2007. Regulatory T cells-a brief history and perspective. *Eur J Immunol*. 37 Suppl 1:S116-23.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J., Yamazaki S., Sakihama T., Itoh M., Kuniyasu Y., Nomura T., Toda M., e Takahashi T. (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182: 18-32.
- .Sakic B., Lacosta S., Denburg J.A. e Szechtman H. (2002) Altered neurotransmission in brains of autoimmune mice: pharmacological and neurochemical evidence. *J Neuroimmunol* 129(1-2): 84-96.
- Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., e Bluestone J.A. (2000) B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12(4): 431-40.
- Sanders V.M., Baker R.A., Ramer-Quinn D.S., Kasprovicz D.J., Fuchs B.A., e Street N.E. (1997) Differential expression of the beta-2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implication for cytokine production and B cell help. *J Immunol* 158: 4200-4210.
- Sanders V.M., e Straub R.H. (2002) Norepinephrine, the β -Adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun* 16: 290-332.
- Savino W., e Dardenne M. (1995) Immune-neuroendocrine interactions. *Immunol Today* 16(7): 318-322.
- Schedlowski M., Hosch W., Oberbeck R., Benschop R.J., Jacobs R., Raab H.R., e Schmidt R.E. (1996) Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent β_2 -adrenergic mechanism. *J Immunol* 156: 93-99.
- Schimpl A., Berberich I., Kneitz B., Kramer S., Santner-Nanan B., Wagner S., Wolf M., e Hunig T. (2002) IL-2 and autoimmune disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(4-5): 369-378.
- Schorr E.C., e Arnason W.B.G. (1999) Interactions between the symphatetic nervous system and the immune system. *Brain Behav Immun* 13: 271-278.
- Schrempf W., e Ziemssen T. (2007) Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 6(7): 469-75.
- Schratzberger P., Reinisch N., Proding W.M., Kahler C.M., Sitte B.A., Bellmann R., Fischer-Colbrie R., Winkler H., e Wiedermann C.J. (1997a) Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 158: 3895-3901.

- Schwartz R. H. 2005. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature immunology*. 6(4):327-30.
- Selmaj K., Raine C.S., Cannella B., e Brosnan C.F. (1991) Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 87: 949-954.
- Selmaj K., Brosnan C.F., e Raine C.S. (1991) Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor and heat shock protein hsp65⁺ oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(15): 6452-6.
- Serra M.C., Calzetti F., Ceska M., e Cassatella M.A. (1994) Effect of SP on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology* 82: 63-69.
- Shanahan F., e Anton P.A. (1994) Role of peptides in the regulation of the mucosal immune inflammatory response. In: Walsh J.H. and Dockray G.J. (Eds) *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*. Raven Press, New York 851-867.
- Sharief M.K., Douglas M., Noori M., e Semra Y.K. (2002) The expression of pro- and anti-apoptosis Bcl-2 family proteins in lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 125(1-2): 155-162.
- Shevach E.M., McHugh R.S., Thornton A.M., Piccirillo C., Natarajan K, e Margulies D.H. (2001) Control of autoimmunity by regulatory T cells. *Adv Exp Med Biol* 490: 21-32.
- Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., e Thornton A.M. (2001) Control of T-cell activation by CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev* 182: 58-67.
- Shevach E.M. (2002) CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2(6): 389-400.
- Sladek-Chelgren S., e Weinshilboum R.M. (1981) Catechol-o-methyltransferase biochemical genetics: human lymphocyte enzyme. *Biochem Genet* 19(11-12): 1037-1053.
- Slotkin T.A., e Edwards K. (1973) Effects of reserpine on the content and properties of rat adrenal medullary storage vesicles. *Biochem Pharmacol* 22: 549-560.
- Spengler R.N., Allen R.M., Remick D.G., Strieter R.M., e Kunkel S.L. (1990) Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol* 145(5): 1430-1434.
- Spengler R.N., Chensue S.W., Giacherio D.A., Blenk N., e Kunkel S.L. (1994) Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor- α production from macrophages *in vitro*. *J Immunol* 152: 3024-3031.
- Stanisz A.M., Befus D., e Bienenstock J. (1986) Differential effects of vasointestinal peptide, substance P and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and spleen. *J Immunol* 136: 152-156.
- Stefano G.B., e Smith E.M. (1996) Adrenocorticotropin – a central trigger in immune responsiveness: tonal inhibition of immune activation. *Med Hypotheses* 46: 471-478.
- Steinman L., Martin R., Bernard C., Conlon P., e Oksenberg J.R. (2002) Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 25: 491-505.
- Straub R.H., Westermann J., Scholmerich J., e Falk W. (1998) Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunol Today* 19(9): 409.
- Straub R.H., Mayer M., Kreutz M., Leeb S., Scholmerich J., e Falk W. (2000) Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractant for monocytes. *J Leukoc Biol* 67(4): 553-558.
- Straub RH, Günzler C, Miller LE, Cutolo M, Schölmerich J, Schill S. Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue *in vivo* and *in vitro*. *FASEB J*. 2002, 16 :993-1000.
- Straub RH. (2004) Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen. *Trends Pharmacol. Sci.* 25:640-6.
- Strom T.B., Lane M.A., e George K. (1981) The parallel, time-dipendent, bimodal change in lymphocyte cholinergic binding activity and cholinergic influence upon lymphocyte-mediated cytotoxicity after lymphocyte activation. *J Neuroimmunol* 127: 705-710.
- Sundstedt A., O'Neill E.J., Nicolson K.S., e Wraith D.C. (2003) Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells *in vivo*. *J Immunol* 170(3): 1240-1248.

- Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, et al. CD4^bCD25^p T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998; 160:1212e8.
- Swanson MA, Lee WT, Sanders VM. (2001) IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4⁺ T cells exposed to norepinephrine. *J. Immunol.* 166:232-40.
- Taguchi O, Nishizuka Y. Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: T cell requirement in adoptive cell transfer. *Clin Exp Immunol.* 1980 Nov;42(2):324-31.
- Takahashi N., Nagai Y., Ueno S., Saeki Y., e Yanagihara T. (1992) Human peripheral blood lymphocytes express D5 dopamine receptor gene and transcribe the two pseudogenes. *FEBS Lett* 314: 23-25.
- Tang Q., Henriksen K.J., Boden E.K., Tooley A.J., Subudhi S.K., Zheng X.X., Strom T.B., e Bluestone J.A. (2003) Cutting edge CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 171: 3348-3352.
- Tayebati S.K., El-Assouad D., Ricci A., e Amenta F. (2002) Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 132: 147-155.
- Temlett, J.A. (1996). Parkinson's disease: biology and aetiology. *Curr.Opin. Neurol.* 9, 303–307.
- Thompson C, e Powrie F. (2004) Regulatory T cells. *Curr Op Pharmacol* 4: 408-414.
- Thornton A.M., e Shevach E.M. (1998) CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188(2): 287-296.
- Titinchi S., e Clark B. (1994) Alpha 2-adrenoceptors in human lymphocytes: direct characterisation by [³H]yohimbine binding. *Biochem Biophys Res Commun* 121(1): 1-7.
- Torres G.E., Gainetdinov R.R., e Caron M.G. (2003) Plasma membrane monamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neuroscience* 4: 13-25.
- Torres K.C., Antonelli L.R., Souza A.L., Teixeira M.M., Dutra W.O., e Gollob K.J. (2005) Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC. *J Neuroimmunol* 166(1-2): 144-157.
- Trendelenburg U., e Weiner N. (1988) Catecholamines I e II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo.
- Tsao C.-W., Lin Y.-S., e Cheng J.-T. (1998) Inhibition of immune cell proliferation with haloperidol and relationship of tyrosine hydroxylase expression to immune cell growth. *Life Science* 62(21): 335-344.
- Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, et al. TNF downmodulates the function of human CD4^bCD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood* 2006;108: 253e61.
- Van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, et al. CD4^(b)CD25^(p) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2004;50:2775e85.
- Van Amelsfort JM, van Roon JA, Noordegraaf M, et al. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4^bCD25^p regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:732e42.
- Van Holten J., Plater-Zyberk C., e Tak P.P. (2002) Interferon-β for treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res* 4: 346-352.
- Van Maurik A., Herber M., Wood K.J., e Jones N.D. (2002) Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8⁺ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J Immunol* 169(10): 5401-5404.
- Varesini G, Barone F, Bompane D, Catuogno M, Sili Scavalli A. La patogenesi dell'artrite reumatoide alla luce degli sviluppi delle conoscenze in immunologia; *Advances in immunology and rheumatoid arthritis pathogenesis. Reumatismo,* 2004; 1 (Suppl. 1):9-20.

- Venken K., Hellings N., Hensen K., Rummens J.L., Medaer R., D'hooghe M.B., Dubois B., Raus J., e Stinissen P. (2006) Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function and FoxP3 expression. *J Neurosci Res* 83: 1432-1446.
- Verhasselt V., Vosters O., Beuneu C., Nicaise C., Stordeur P., e Goldman M. (2004) Induction of FoxP3-expressing regulatory CD4⁺ T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol* 34(3): 762-772.
- Vieira P.L., Heystek H.C., Wormmeester J., Wierenga E.A., e Kapsenberg M.L. (2003) Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J Immunol* 170(9): 4483-4488.
- Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., e Hafler D.A. (2004) Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199: 971-979.
- Vigouroux S., Yvon E., Biagi E., e Brenner M.K. (2004) Antigen-induced regulatory T cells. *Blood* 104(1): 26-33.
- Viguier M., Lemaitre F., Verola O., Cho M.S., Gorochov G., Dubertret L., Bachelez H., Kourilsky P., e Ferradini L. (2004) FoxP3 expressing CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173(2): 1444-1453.
- Vogt M. (1954) The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *J Physiol (Lond)* 123: 451-481.
- von Euler E.S. (1946) A specific sympatho-mimetic ergone in adrenergic nerve fibers (sympathin) and its relations to adrenaline and noradrenaline. *Acta Physiol Scand* 12: 73-97.
- Wadler S. (1982) The role of interferons in the treatment of solid tumors. *Cancer* 70(Suppl.4): 949-958.
- Wahle M., Hanefeld G., Brunn S., Straub RH, Wagner U, Krause A, Häntzschel H, Baerwald CG. Failure of catecholamines to shift T-cell cytokine responses toward a Th2 profile in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2006, 8: R138.
- Wahlestedt C., e Reis D.J. (1993) Neuropeptide Y-related peptides and their receptors-are the receptors potential therapeutic drug targets? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 309-352.
- Waldmann H. (2003) Regulating the rejection process: the search for new target to minimise immunosuppressive therapy. *Curr Opin Immunol* 15: 477-478.
- Waldmann T.A. (2006) Effective cancer therapy through immunomodulation. *Annu Rev Med* 57: 65-81.
- Walker M.R., Kasprovicz D.J., Gersuk V.H., Bènard A., Van Landeghen M., Buckner J.H., e Ziegler S.F. (2003) Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest* 112: 1437-1443.
- Wang Z., Hong J., Sun W., Xu G., Li N., Chen X., Liu A., Xu L., Sun B., e Zhang J.Z. (2005) Role of IFN- γ in induction of FoxP3 and conversion of CD4⁺CD25⁻ T cells to CD4⁺ Treg. *J Clin Invest* 116: 2434-2441.
- Watanabe Y., Nakayama T., Nagakubo D., Hieshima K., Jin Z., Katou F., Hashimoto K., e Yoshie O. (2006) Dopamine selectively induces migration and homing of naive CD8⁺ T cells via dopamine receptor D₃. *J Immunol* 176: 848-856.
- Watson F., Eavall D.G., Macro J.A., Iernan R., e Dimaline R. (1999) Transcriptional activation of vesicular monoamine transporter 2 in the pre-B cell line Ea3.123. *Biochem J* 337: 193-199.
- Weber M.S., Hohlfeld R., e Zamvil S.S. (2007) Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurother* 4(4): 647-653.
- White S.R., Black P.C., Samathanam G.K., e Paros K.C. (1992) Prazosin suppresses development of axonal damage in rats inoculated for experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 39: 211-218.
- Wick M.M. (1982) Therapeutic effect of dopamine infusion on human malignant melanoma. *Cancer Treat Rep* 66(8): 1657-1659.

- Wiegmann K., Muthyala S., Kim D.H., Arnason B.G., e Chelmicka-Schorr E. (1995) β -adrenergic agonists suppress chronic/relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 56: 201-206.
- Wilder RL (1995) Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 13:307–338.
- Williams L.T., Snyderman R., e Lefkowitz R.J. (1976) Identification of beta-adrenergic receptors in human lymphocytes by (-) (3H) alprenolol binding. *Clin Invest* 57: 149-155.
- Williamson J.R., Thomas A.P., Williams R.J., Alexander J., e Selak M.A. (1986) Calcium compartmentation and regulation in myocytes. *Adv Exp Med Biol* 194: 573-590.
- Wolf A.M., Wolf D., Steurer M., Gastl G., Gunsilius E., e Grubeck-Loebenstein B. (2003) Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9: 606-612.
- Yates, J. *et al.* The maintenance of human CD4+ CD25+ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency *in vitro*. *Int. Immunol.* **19**, 785–799 (2007).
- Yoles E., Hauben E., Palgi O., Agranov E., Gothilf A., Cohen A., Kuchroo V., Cohen I.R., Weiner H., e Schwartz M. (2001) Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci* 21(11): 3740-3748.
- Yong V.W., Chabot S., Stuve O., e Williams G. (1998) Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* 51: 682-689.
- Yoshimori T., Yamamoto A., Moriyama Y., Futai, e Tashiro Y. (1991) Bafilomycin-A₁, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *Journal Biol Chem* 266: 17707-17712.
- Youatt J. (1993) Calcium and microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 19(2): 83-97.
- Zaffaroni M. (2005) Treatment optimisation in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 26 Suppl 4: S187-92.
- Zaffaroni M., Cosentino M., Marino F., Ferrari M., Rasini E., Monti M., Bombelli R., Perusin M., Carcano E., Pilato V., Frigo G., Ghezzi A., Comi G., e Lecchini S. (2005) Increase of endogenous catecholamine production, β 2-adrenoceptor and dopamine D5 receptor expression in circulating lymphocytes from patients with multiple sclerosis undergoing interferon- β treatment. *Neurol Sci* 26 (Suppl): S68.
- Zheng S.G., Wang J.H., Gray J.D., Soucier H., e Horwitz D.A. (2004) Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J Immunol* 172: 5213-5221.
- Zou W. (2006) Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6: 295-307.
- Zoukos Y., Leonard J.P., Thomaides T., Thompson A.J., e Cuzner M.L. (1992) Beta-adrenergic receptor density and function of peripheral blood mononuclear cells are increased in multiple sclerosis: a regulatory role for cortisol and interleukin-1. *Ann Neurol* 31: 657-662.
- Zoukos Y., Kidd D., Woodroffe M.N., Kendall B.E., Thompson A.J., e Cuzner M.L. (1994) Increased expression of high affinity IL-2 receptors and β -adrenoreceptors in peripheral blood mononuclear cells is associated with clinical and MRI activity in multiple sclerosis. *Brain* 117: 307-315.