

LAVORO ORIGINALE

Il ruolo dell'Interleuchina-12 nelle malattie reumatiche a patogenesi immunitaria

The role of Interleukin-12 in immune-mediated rheumatic diseases

A. Spadaro, R. Scrivo, T. Rinaldi, V. Ricciari, A. Sili Scavalli, E. Taccari¹, G. Valesini

Dipartimento di Terapia Medica, Unità di Reumatologia, I Facoltà di Medicina
¹Unità di Reumatologia, II Facoltà di Medicina. Università di Roma "La Sapienza"

SUMMARY

Objective: *IL-12 is a proinflammatory cytokine produced by different antigen presenting cells. It has been shown to exert a critical role in inducing Th1 phenotype, thus initiating cell-mediated immune responses, but the significance of IL-12 in rheumatic diseases is not clear. Aim of the study was to determine IL-12 serum levels in immune rheumatic diseases and to analyse the relationship of this cytokine with main clinical and laboratory parameters.*

Methods: *we analysed, by ELISA, serum IL-12 levels in 114 patients with SLE, 47 with SS, 32 with SSc, 84 with RA, 138 with PA and in 17 healthy controls. We also examined main clinical and laboratory parameters, including autoantibody profile and clinical indices of disease activity.*

Results: *IL-12 serum levels were significantly higher in SLE and SS patients respect to controls. IL-12 serum levels were significantly higher in SLE patients compared to those affected by RA, PA and SSc. When we evaluated disease activity in SLE patients, we found significantly higher IL-12 serum levels in subjects with fever or in those without renal involvement, while no correlation was found in the other rheumatic immune diseases.*

Conclusions: *these findings suggest that IL-12, modulating cell and humoral immune responses, is involved in the pathogenesis of immune rheumatic diseases, such as SLE and SS.*

Reumatismo, 2002; 54(2):113-121

INTRODUZIONE

L'interleuchina 12 (IL-12) è una citochina (CK) proinfiammatoria denominata inizialmente, per le sue proprietà, fattore di maturazione dei linfociti citotossici o anche fattore di stimolazione delle cellule natural killer (NK) (1). Isolata originariamente dai linfociti B infettati dal virus di Epstein Barr (2), questa CK è prodotta, in seguito a stimolo del tumor necrosis factor- α (TNF- α), non solo dai linfociti B attivati, ma anche dai fagociti, dalle cellule dendritiche, dalle cellule di Langerhans e dai cheratinociti in risposta a stimoli batterici come il lipopolisaccaride o lo *Staphylococcus Aureus* Cowan 1, e ai parassiti intracellulari (3-4). La sua secrezione può avvenire anche in maniera T-dipendente attraverso l'interazione tra

CD40, molecola di superficie espressa dai monociti e dalle cellule dendritiche, e il suo ligando CD154 presente sui linfociti T attivati (5).

L'IL-12 possiede una peculiare struttura rispetto alle altre CK (1): è costituita da una catena leggera α di 35 kDa (p35), specie-specifica, e da una pesante β di 40 kDa (p40), che controlla il legame al recettore. Le due subunità sono legate tra loro attraverso un ponte disolfuro a costituire l'eterodimero p70 biologicamente attivo (4).

Impiegando modelli animali di malattie autoimmuni, è stato dimostrato che IL-12 svolge un ruolo critico nel modulare l'equilibrio tra i linfociti T helper-1 (Th-1) e T helper-2 (Th-2) (6-8), favorendo lo sviluppo del sottotipo Th-1 e quindi l'induzione delle risposte immunitarie cellulo-mediate (9). IL-12 agisce inoltre come fattore di crescita nei confronti delle cellule NK e dei linfociti T attivati, potenziandone l'azione citotossica attraverso la stimolazione della sintesi di altre CK, come il TNF- α e l'interferon- γ (IFN- γ) (2, 10). L'IFN- γ , a sua volta, accresce la capacità dei fa-

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Antonio Spadaro, Dipartimento di Terapia Medica, Divisione di Reumatologia Azienda Policlinico Umberto I, Viale del Policlinico 155, 00161 Roma, E-mail: a.spadaro.reuma@virgilio.it

gociti e delle cellule dendritiche di produrre IL-12 e altre CK proinfiammatorie, generando un importante circuito di amplificazione delle risposte immunitarie nei confronti degli stimoli infettivi e determinando un pericoloso meccanismo che può portare alla sintesi incontrollata di CK, con conseguente scatenamento di malattie autoimmuni o riasacerbazione delle stesse nel corso di infezioni intercorrenti (3, 11-13). Peraltro nei soggetti con una predisposizione genetica alle malattie autoimmuni, i linfociti T autoreattivi potrebbero indurre la secrezione di questa CK da parte delle cellule presentanti l'antigene anche in assenza di stimoli infettivi (14).

Le risposte immunitarie cellulo-mediate sembrerebbero prevalere nell'artrite reumatoide (AR) (3, 15-17) e nell'artrite psoriasica (AP) (18), mentre nelle connettiviti come il lupus eritematoso sistemico (LES) (19-20) e la sclerosi sistemica (Scl) predomina l'immunità umorale indotta dai linfociti Th-2 (21-22).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di determinare e confrontare i livelli sierici di IL-12 nelle principali malattie reumatiche a patogenesi autoimmune e di studiare le relazioni con le caratteristiche cliniche e di laboratorio, con particolare riguardo all'attività di malattia.

PAZIENTI E METODI

Abbiamo selezionato 415 malati, di cui 114 affetti da LES classificati secondo i criteri ARA (23), 47 da sindrome di Sjögren (SS) in accordo con i criteri di Vitali et al. (24), 32 da Scl secondo i criteri ACR (25), 84 da AR in accordo con i criteri ARA (26) e 138 da AP definita come un'artrite persistentemente sieronegativa associata a psoriasi cutanea (27).

In tutti i malati sono stati esaminati i principali parametri clinici e di laboratorio, permettendo sia la tipizzazione del profilo autoanticorpale che la valutazione dell'attività di ogni singola malattia. In particolare nei malati con LES l'attività di malattia è stata valutata in accordo al "Systemic lupus erythematosus disease activity index" (SLEDAI) (28). In tutti i malati e in 17 controlli sani (M/F=4/13; età media/range = 47.4/29-68 anni) sono stati determinati i livelli sierici di IL-12 mediante metodica immunoenzimatica (ELISA).

Determinazione di IL-12 (p70): La determinazione di IL-12 è stata eseguita su campioni di siero

conservati a -70° utilizzando un test ELISA (Bender Medsystem, Vienna, Austria). I micropozzetti di polistirene sono stati incubati tutta la notte a 4°C con un anticorpo monoclonale murino diretto contro IL-12. Successivamente dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente con PBS-Tween 20 (0.05%) contenente siero-albumina bovina (0.5%), sono stati aggiunti ai pozzetti i campioni sierici e l'anticorpo monoclonale murino coniugato con biotina (1:5000) diretto contro l'IL-12. Due ore dopo è stata aggiunta streptavidina-HRP. Al termine del periodo di incubazione è stata aggiunta la soluzione di substrato (miscela 1:2 di H_2O_2 e tetrametilbenzidina) e la reazione è stata bloccata dopo 15 minuti con acido solforico 4N. I lavaggi sono stati effettuati utilizzando PBS contenente Tween 20 (0.05%).

La densità ottica è stata determinata con uno spettrofotometro Titertek Multiscan (Flow Laboratories) ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Ciascun campione è stato analizzato in duplicato e per ognuno è stata calcolata la media del valore di assorbimento espressa in pg/ml usando un'opportuna curva di calibrazione. Il test presentava un limite di sensibilità di 3.2 pg/ml. I coefficienti di variazione inter- e intra-assay per IL-12 erano rispettivamente 3% e 4.8%.

Analisi statistica: L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando per il confronto fra percentuali il test esatto di Fisher o il test del χ^2 , mentre per le variabili continue sono stati utilizzati il test di Mann-Whitney per campioni indipendenti. La significatività delle correlazioni è stata valutata con il coefficiente di correlazione dei ranghi di Spearman. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

Le principali caratteristiche demografiche e di laboratorio della casistica dello studio sono mostrate nella tabella I. Livelli di IL-12 al di sopra della media + 2 DS (17 pg/ml) dei controlli sono stati definiti elevati.

La presenza di livelli sierici elevati di IL-12 è stata riscontrata nel 71.9%, 27.7%, 18.7%, 22.6%, 13.0% rispettivamente dei malati con LES, SS, Scl, AR e AP. La frequenza era significativamente più elevata nei malati con LES rispetto ai malati con SS ($p < 0.0000001$), Scl ($p < 0.0000002$), AR ($p < 0.0000001$), AP ($p < 0.0000001$). I malati con

Tabella I - Principali caratteristiche demografiche, cliniche e di laboratorio dei pazienti ammessi allo studio.

	LES	SS	Scl	AR	AP
Numero	114	47	32	84	138
Età (anni)*	38.3 (15-70)	54.8 (26-81)	50.6 (20-73)	55.2 (25-76)	49,1 (17-75)
Età all'esordio (anni)*	32.2 (10-65)	48.2 (24-80)	40.2 (15-71)	46.6 (21-74)	42,1 (11-67)
Sesso (F/M)	97/17	46/1	31/1	62/22	26/112
Durata di malattia (mesi)*	76.9 (1-456)	85.03 (3-540)	113.5 (12-276)	116 (5-605)	74,3 (1-360)
VES (mm/h)**	30 (16-52)	35 (22-48)	24 (10-56)	45 (30-65)	24,5 (13-39)
PCR (mg/l)**	6 (6-24)	6 (6-12)	3 (0-24)	24 (12-48)	12 (6-24)
FR (%)	32.4	78.7	43.7	75.0	0
ANA (%)	97.4	93.6	96.8	22.6	0
Anti-dsDNA (%)	64.9	0	0	0	0
Anti-SSA/Ro (%)	39.5	68.0	18.7	0	0
Anti-SSB/La (%)	19.3	44.7	3.1	0	0
Anti-Sm (%)	26.3	2.1	3.1	0	0
Anti-RNP (%)	23.7	4.2	28.1	0	0
Anti-Scl70 (%)	1.0	0	37.5	0	0
Terapia in atto:					
cortisonici (%)	92.1	34.0	25.0	54.8	31.9
immunosoppressori (%)	14.0	4.2	18.7	17.9	16.6
* Media (range)					
** Mediana (25° - 75° percentile)					

SS presentavano inoltre una frequenza significativamente più elevata rispetto ai malati con AP ($p < 0.036$).

Sono stati riscontrati livelli sierici di IL-12 (mediana/25°-75° percentile) significativamente più elevati nei malati con LES (31.5/14-50 pg/ml; $p < 0.000005$) e SS (8/0-25 pg/ml; $p < 0.021$) rispetto ai controlli (0/0-5.6 pg/ml). Inoltre i livelli di IL-

12 nel LES erano significativamente più alti rispetto ai malati con AR (0/0-2.5 pg/ml; $p < 0.000001$), AP (0/0-2 pg/ml; $p < 0.00001$) e Scl (1/0-11.4 pg/ml; $p < 0.0005$) (Fig. 1).

Nei malati con LES la valutazione dell'attività di malattia mediante SLEDAI ha evidenziato livelli di IL-12 significativamente più elevati nei soggetti senza interessamento renale (35/22-62 pg/ml;

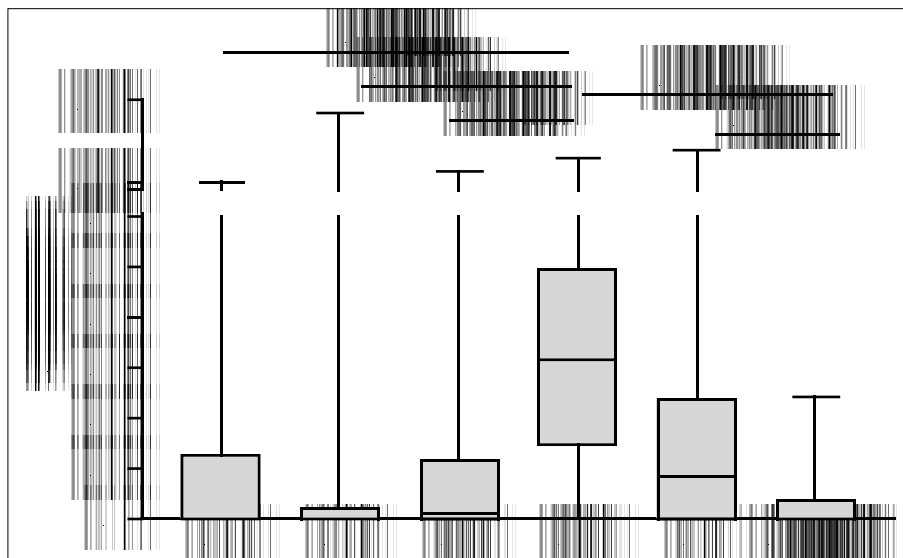


Figura 1 - Livelli di IL-12 (grafico box e whiskers: mediana 25°-75° percentile/range) nei malati con LES (n=114), SS (n=47), Scl (n=32), AR (n=84), AP (n=138) e nei controlli sani (n=17).

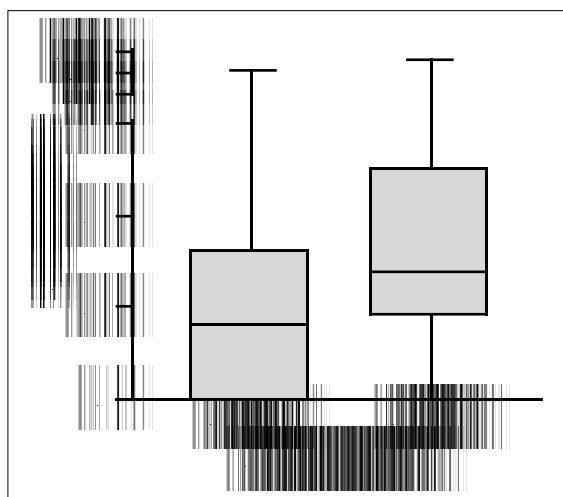


Figura 2a - Livelli di IL-12 (grafico box e whiskers: mediana 25°-75° percentile/range) nei malati di LES con (n=31) o senza (n=83) alterazioni renali.

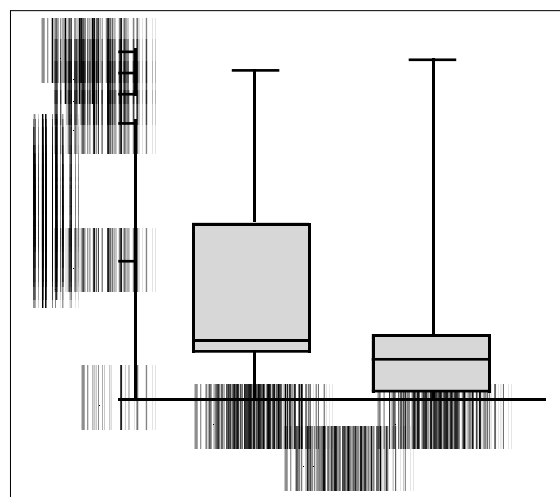


Figura 2b - Livelli di IL-12 (grafico box e whiskers: mediana 25°-75° percentile/range) nei malati di LES con (n=18) o senza (n=96) febbre.

$p < 0.026$) (Fig. 2a) o con febbre (44/33.5-126.5 pg/ml; $p < 0.009$) (Fig. 2b). La frequenza del coinvolgimento d'organo determinato utilizzando lo SLEDAI nei malati di LES con livelli elevati o normali di IL-12 è mostrata nella tabella II. Nelle altre patologie esaminate i livelli di IL-12 non correlavano con alcun parametro clinico o di laboratorio. Il profilo autoanticorpale caratteristico delle varie patologie prese in esame non era associato con la presenza di IL-12.

Nessuna correlazione è stata riscontrata fra i livelli sierici di IL-12 e la durata di malattia nei soggetti con LES (Fig. 3) o con le altre patologie di interesse reumatologico esaminate nello studio. Nessuna associazione è stata evidenziata fra i livelli di IL-12 e la terapia in atto.

DISCUSSIONE

Lo sbilanciamento tra le CK prodotte dai linfociti Th-1 e Th-2 può essere responsabile dello sviluppo di alcune malattie autoimmuni, come dimostrato anche dal fatto che la correzione di questo squilibrio riveste un significato preventivo e terapeutico in diversi modelli animali di autoimmunità (29-33). Nell'ambito del sistema delle CK, l'IL-12 promuove la sintesi dei linfociti Th-1 e inibisce la produzione delle IgE indotta da IL-4; d'altra parte, la stessa IL-4, assieme a IL-10 e IL-13, sopprime la formazione dei linfociti Th-1 attraverso l'inibizione del rilascio di IL-12 da parte dei monociti (34-37). Le connettiviti (19, 21-22, 33), caratterizzate da una attivazione policlonale dei linfociti B, sem-

Tabella II - Frequenza del coinvolgimento d'organo nei malati di LES con livelli sierici di IL-12 elevati o normali.

		Livelli elevati di IL-12 (n= 82)	Livelli normali di IL-12 (n= 32)
SNC	(n= 9)	7	2
Vascolare	(n= 14)	8	6
Renale	(n= 31)	17 *	14
Muscoloscheletrico	(n= 33)	22	11
Sierose	(n= 5)	2	3
Alterazioni immunologiche	(n= 49)	31	18
Cute	(n= 28)	20	8
Sintomi generali	(n= 18)	16	2
Alterazioni ematologiche	(n= 9)	4	5

* $p < 0.025$

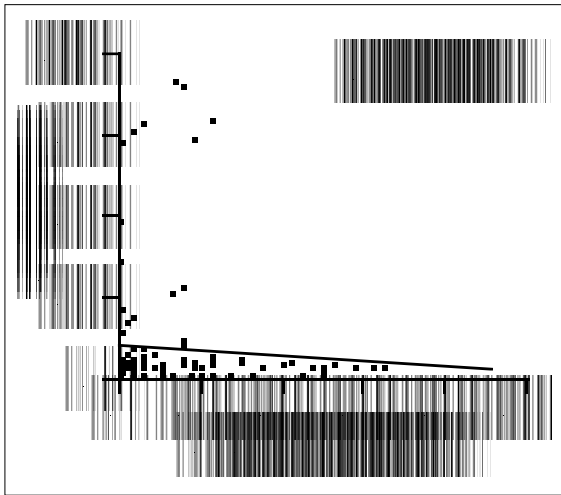


Figura 3 - Regressione lineare di IL-12 vs durata di malattia nei malati di LES.

brano essere associate all'immunità umorale delle cellule Th-2, mentre l'AR e l'AP sono ritenute malattie prevalentemente legate all'iperattività dei linfociti Th-1 (15, 38-39).

Il riscontro nei nostri malati di livelli elevati di IL-12 nel LES induce a ritenere che questa patologia non può essere considerata esclusivamente Th-2 mediata, come suggerito dalla coesistenza dell'iperattività dei linfociti B e delle alterazioni dell'immunità cellulo-mediata (40). Anche Akahoshi et al. hanno analizzato il rapporto Th-1/Th-2 dei linfociti periferici nei pazienti con LES e hanno dimostrato che questo non era sbilanciato verso le CK Th-2, anzi, nei pazienti con nefrite classe IV WHO, vi era una netta predominanza dei Th-1 (41). Ulteriori riscontri in questo senso provengono dallo studio di Tokano et al., in cui i livelli di IL-12 nel siero di pazienti affetti da LES in fase attiva erano significativamente più elevati nei malati rispetto ai controlli sani. Inoltre, coloro che presentavano elevati livelli di IL-12, avevano anche alti valori di IFN- γ , mentre la concentrazione di IL-13 era significativamente più bassa. È interessante rilevare che i pazienti con livelli anormali di IL-12 presentavano una frequenza significativamente più alta di manifestazioni polmonari come pleuriti e polmoniti, mentre nei soggetti con livelli normali di questa CK era presente una più elevata, sebbene non significativa, percentuale di pazienti con interessamento renale (42). Quest'ultimo aspetto emerge anche dal nostro studio, in cui abbiamo evidenziato l'associazione di bassi livelli di IL-12 nel siero

dei malati affetti da LES con impegno renale. Anche se questi risultati appaiono di non facile interpretazione, concentrazioni minori di questa CK sono presenti nelle fasi attive della malattia, quando probabilmente l'eccessiva produzione di IL-10, che usualmente si riscontra nel LES (43), è in grado di inibire il rilascio di IL-12 (44). Inoltre, un ulteriore elemento di complessità nella valutazione del ruolo dell'IL-12 nell'impegno renale deriva dalla determinazione delle singole subunità p40 e p70 (45-46), caratterizzate da un differente spettro d'azione (47-49). Al di là del ruolo rivestito dalle due catene costitutive dell'IL-12, l'importanza di questa CK nel quadro del LES potrebbe dipendere anche dalle diverse fasi della malattia. In modelli animali di LES indotto sperimentalmente è stato dimostrato che le CK Th-1 predominano nello stadio iniziale, quando invece le CK Th-2 potrebbero ricoprire un ruolo protettivo (50-53). Un analogo meccanismo è stato ipotizzato nelle malattie autoimmuni umane, per le quali si ritiene che nelle fasi precoci prevalga l'azione di IL-12 e IFN- γ , in grado di indurre le risposte immunitarie Th-1, mentre, più tardivamente, le stesse CK potrebbero portare alla morte delle cellule T autoreattive (54). Dallo studio di Horwitz et al., tuttavia, emergono risultati opposti: nelle fasi precoci del LES la produzione di IL-10 è aumentata e quella di IL-12 p40, oltre che di IFN- γ e TNF- α , è ridotta (43). Questi dati sono in accordo con i risultati della nostra casistica, in cui non è stata riscontrata alcuna correlazione fra i livelli di IL-12 e la durata del LES, suggerendo che in vivo i livelli di questa CK non correlano con lo stadio iniziale della malattia.

Il nostro studio, comunque, conferma l'azione proinfiammatoria dell'IL-12, dal momento che abbiamo dimostrato nei malati con LES l'associazione, in vivo, tra la febbre e gli elevati livelli sierici di questa CK.

I dati che emergono dall'analisi della nostra casistica evidenziano inoltre che anche nella SS i livelli sierici di IL-12 sono significativamente più elevati rispetto ai controlli. Sebbene non siano stati pubblicati precedenti riscontri in tal senso, studi di immunostochimica hanno dimostrato che la maggior parte dei linfociti infiltranti le ghiandole salivari sono di tipo CD4+ (55) e producono, rispetto agli stessi linfociti del sangue periferico, prevalentemente IL-2 e IFN- γ , con piccole quantità di IL-10, indicando che le CK prodotte dai linfociti Th-1 sono essenziali per l'induzione e il mantenimento della SS (56). Questi risultati sono stati confermati dal riscontro nelle lesioni parotidiche prelinfoma-

tose di un eccesso di linfociti Th-1 CD4+ in grado di produrre prevalentemente IL-12 rispetto a IL-4. Tuttavia non era presente una netta prevalenza di un profilo citochinico sull'altro, in accordo con quanto messo in luce dagli studi in vivo (57). L'evidenza che nella SS l'IL-12 viene espressa in maggiore quantità a livello delle ghiandole salivari, suggerisce che questa CK agisce prevalentemente a livello locale, come peraltro rilevato nell'AR. Infatti è stato riportato che non solo i livelli di IL-12 p70 erano significativamente più elevati nel siero e nel liquido sinoviale dei malati con AR rispetto a quelli con osteoartrosi (OA), ma soprattutto che nell'AR la concentrazione di IL-12 era più elevata nel liquido sinoviale rispetto al siero, mentre non c'era alcuna differenza tra loro nei malati con OA (58-59). La dimostrazione della produzione locale di IL-12 sarebbe sostenuta dal riscontro di livelli di IL-12 biologicamente attivi nel sovrantante di colture di cellule provenienti da articolazioni reumatoidi (60) e dall'evidenza che l'mRNA per la frazione p40 dell'IL-12 è espresso nella membrana sinoviale di malati con AR e OA (17, 38), con differenze rispetto ai soggetti artrosici di non univoca interpretazione. Ad ulteriore riprova di questa possibilità si inserisce il risultato dello studio di Ferraccioli et al., che, confrontando i livelli sierici di CK pro- ed antiinfiammatorie in un gruppo di pazienti affetti da AR rispetto ai controlli sani, non ha riscontrato differenze statisticamente significative nei livelli di IL-12, che risultavano nella maggior parte dei casi al di sotto del limite di sensibilità del metodo di determinazione. In ogni caso, i livelli di IL-12 correlavano sia con il numero delle articolazioni tumefatte che con una progressiva riduzione dei livelli di questa CK nell'arco di 12 mesi di trattamento con ciclosporina A associata o meno ad idrossiclorochina (61). Questa correlazione con l'attività di malattia sarebbe in accordo con lo studio di Kim et al., da cui emergeva l'associazione di IL-12 sierica con il numero di articolazioni dolenti e tumefatte e con i valori elevati di PCR, mentre, dopo trattamento con DMARDs, i livelli di questa CK tendevano a ridursi (58). Pertanto, sulla base di questi studi, che concordano nel sostenere la prevalente produzione articolare di IL-12 nell'AR, non appaiono sorprendenti i risultati della nostra casistica, che dimostrano livelli sierici normali di IL-12 nei pazienti affetti da AR e da AP. Inoltre è da rilevare come non è ben definito il pattern citochinico prevalente nell'AR e nell'AP. Infatti, nel siero e nel liquido sinoviale dei pazienti con AR, il rapporto IL-4/IFN- γ è aumen-

tato, suggerendo che questa malattia è mediata dai linfociti Th-2 (3, 18, 62). A conferma di questo dato, Cush et al. hanno messo in evidenza, nel siero di soggetti affetti da AR, elevati livelli di IL-10 che correlavano con il titolo del fattore reumatoide sierico (63). Al contrario altri autori, nel liquido e nella membrana sinoviale dei pazienti affetti da AP e da AR, hanno evidenziato che nelle due patologie sono presenti CK sia di origine Th-1 che Th-2, con una predominanza del fenotipo Th-1 e differenze nelle due patologie più di natura quantitativa che qualitativa (64-65).

Nell'AR, così come è stato ipotizzato per il LES, queste discrepanze potrebbero essere spiegate dal diverso pattern citochinico in rapporto ai differenti periodi di malattia: in effetti, nei topi con artrite indotta da collagene, si è visto che la terapia con anti-IL-12 è efficace solo se attuata nelle fasi molto precoci della malattia, ma inutile successivamente (66), quando potrebbero prevalere le CK Th-2.

Nella Scl il ruolo dell'IL-12 appare di difficile interpretazione in quanto in questa patologia, caratterizzata da una polarizzazione verso i linfociti Th-2, sono stati dimostrati sia livelli sierici anormali di IL-4, IL-10 e IL-13 (21) che di IL-12 (67). I livelli di IL-12 correlavano con il danno vascolare renale, ed erano al di sopra di 2 DS (3.7 pg/ml) dei soggetti di controllo nel 37% dei casi. Considerando che questo valore è simile al limite di sensibilità del metodo e inferiore al cut-off utilizzato nel nostro studio, i nostri risultati non appaiono discordanti e confermano l'evidenza di livelli di questa CK non particolarmente elevati (<15 pg/ml) nella Scl (67). Del resto, i riscontri della letteratura internazionale non sono univoci, probabilmente non solo a causa dell'eterogeneità e della ridondanza delle CK coinvolte nella patogenesi delle malattie autoimmuni, ma anche per la diversità delle casistiche esaminate e per l'uso di metodi con limiti di sensibilità spesso differenti.

In conclusione, anche se la misurazione delle CK a livello sierico può dare delle indicazioni parziali, il nostro studio conferma la partecipazione dell'IL-12 nella patogenesi di malattie reumatiche autoimmuni come il LES e la SS, suggerendo che non è possibile effettuare una netta dicotomia tra malattie reumatiche Th-1 o Th-2 mediate. In particolare assume importanza la capacità dell'IL-12 di modulare sia l'immunità cellulare che quella umorale, in un contesto nel quale partecipano svariate molecole solubili che interagiscono tra loro in tempi diversi con vari effetti sulla regolazione delle risposte immunitarie.

RIASSUNTO

L'obiettivo è stato di studiare l'IL-12 nelle principali malattie reumatiche immuno-mediate. I livelli sierici di IL-12 erano più elevati nei malati con LES e SS rispetto ai controlli. I livelli di IL-12 nel LES erano più alti rispetto ai malati con AR, AP e Scl. Nel LES i livelli di IL-12 erano più elevati nei soggetti con febbre o senza interessamento renale. Nelle altre patologie i livelli di IL-12 non correlavano con alcun parametro clinico o di laboratorio. Questi risultati suggeriscono che l'IL-12, in grado di modulare l'immunità sia cellulare che umorale, interviene nella patogenesi del LES e della SS.

Parole chiave: Interleuchina-12, malattie reumatiche, attività di malattia.

Key words: *Interleukin-12, rheumatic diseases, disease activity.*

BIBLIOGRAFIA

- Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K et al. Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol* 1995; 154: 116-27.
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170: 827-45.
- Miossec P, van der Berg W. Th1/Th2 cytokine balance in Arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2105-15.
- Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 251-76.
- DeKruyff RH, Gieni RS, Umetsu DT. Antigen-driven but not lipopolysaccharide-driven IL-12 production in macrophages requires triggering of CD-40. *J Immunol* 1997; 158: 359-66.
- Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, Neurath M, Strober W. Induction and prevention of colonic inflammation in IL-12 deficient mice. *J Immunol* 1997; 158: 566-73.
- Leonard JO, Waldburger KE, Goldman SJ. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by an antibody against interleukin 12. *J Exp Med* 1995; 181: 381-6.
- Germann T, Szeliga J, Hess H, Storkel S, Podlaski FJ, Gately MK et al. Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4823-7.
- Mossman TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
- Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U et al. The interleukin-12/interleukin-12 receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Interleukin-12*. *Ann Rev Immunol* 1998; 16: 495-521.
- Carra G, Gerosa F, Trinchieri G. Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12. *J Immunol* 2000; 164: 4752-61.
- Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF et al. The interleukin-12 (p40) gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* 1996; 183: 147-57.
- Adorini L, Aloisi F, Galbiati F, Gately MK, Gregori S, Penna G et al. Targeting IL-12, the key cytokine driving Th1-mediated autoimmune diseases. In: Adorini L, editors. *IL-12*. Chem Immunol. Basel, Karger, 1997, vol. 68, 175-97.
- Chang JT, Shevach EM, Segal BM. Regulation of interleukin (IL)-12 receptor b2 subunit expression by endogenous IL-12: a critical step in the differentiation of pathogenic autoreactive T cells. *J Exp Med* 1999; 189: 969-78.
- Dolhain RJEM, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AMM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1961-9.
- Trembleau S, Germann T, Gately MK, Adorini L. The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995; 16: 383-6.
- Morita Y, Yamamura M, Nishida K, Harada S, Okamoto H, Inoue H et al. Expression of interleukin-12 in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 306-14.
- Schlaak JF, Pfers I, Meyer Zum Büschenfelde K-H, Märker-Hermann E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 155-62.
- Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J, Llorente L. High levels of Th2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus. *Rev Invest Clin* 1995; 47: 267-72.
- Barcellini W, Rizzardi GP, Borghi MO, Nicoletti F, Fain C, Del Papa N et al. In vitro type-1 and type-2 cytokine production in systemic lupus erythematosus: lack of relationship with clinical disease activity. *Lupus* 1996; 5: 139-45.
- Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997; 24: 328-32.
- Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interferon- γ levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 67-72.

23. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
24. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos H, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's Syndrome: results of a prospective concerted action supported by the European community. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 340-7.
25. Subcommittee for Scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
26. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries GF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
27. Michet JM. Psoriatic arthritis. In: Kelley WN, Harris ED jr, Ruddy S, Sledge CB, editors. *Textbook of rheumatology*. Philadelphia: WB Saunders 1993; 974-84.
28. Bombardier C, Gladmann DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630-40.
29. Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med* 1994; 179: 305-10.
30. Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH et al. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1994; 178: 87-99.
31. Racke MK, Bonomo A, Scott DE, Cannella B, Levine A, Raine CS et al. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J Exp Med* 1994; 180: 1961-6.
32. Nicholson LB, Greer JM, Sobel RA, Lees MB, Kuchroo VK. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 1995; 3: 397-405.
33. Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol Today* 1993; 14: 335-8.
34. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinini M-P, Maggi E, Trinchieri G et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12, IL-12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1199-204.
35. Kuniwa M, Gately M, Gubler U, Chizzonite R, Fargeas C, Delespesse G. Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of IgE by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* 1992; 90: 262-6.
36. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocytes interferon-gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1041-8.
37. de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 1993; 151: 6370-81.
38. Sakkas LI, Johanson NA, Scanzello CR, Platsoucas CD. Interleukin-12 is expressed by infiltrating macrophages and synovial lining cells in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Cellular Immunology* 1998; 188: 105-10.
39. Partsch G, Steiner G, Leeb BF, Dunky A, Bröll H, Smolen JS. Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. *J Rheumatol* 1997; 24: 518-23.
40. Horwitz DA, Stohl W, Gray JD. T lymphocytes, NK cells and cytokines in systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' lupus erythematosus*, 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997: 155-94.
41. Akahoshi M, Nakashima H, Tanaka Y, Kohsaka T, Nagano S, Ohgami E et al. Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1644-48.
42. Tokano Y, Morimoto S, Kaneko H, Amano H, Nozawa K, Takasaki Y et al. Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)-relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 169-73.
43. Horwitz DA, Gray JD, Behrendsen SC, Kubin M, Rengaraju M, Ohtsuka K et al. Decreased production of interleukin-12 and other Th1-type cytokines in patients with recent-onset Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 838-44.
44. Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E, Isenberg DA. Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 243-51.
45. Lauwerys BR, Houssiau FA. Serum IL-12 p40 levels in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 2001; 10 (1 Suppl): S29.
46. Lauwerys BR, Houssiau FA. Longitudinal measurements of serum IL-10 and IL-12 p40 titers in systemic lupus erythematosus patients with proliferative glomerulonephritis. *Lupus* 2001; 10 (1 Suppl): S30.
47. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol* 1998; 160: 5936-44.
48. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste-Amezaga M et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (NKSf/IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1992; 176: 1287.
49. Brunda MJ. Interleukin-12. *J Leuk Biol* 1994; 55: 280-8.
50. Zhang GX, Navikas V, Link H. Cytokines in the pathogenesis of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 1997; 20: 543-51.
51. Segal R, Bermas BL, Dayan M, Kalush F, Shearer GM,

- Moze E. Kinetics of cytokine production in experimental systemic lupus erythematosus: involvement of T helper cell 1/T helper cell 2-type cytokines in disease. *J Immunol* 1997; 158: 3009-16.
52. Santiago ML, Fossati L, Jacquet C, Muller W, Izui S, Reininger L. Interleukin-4 protects against a genetically linked lupus-like autoimmune syndrome. *J Exp Med* 1997; 185: 65-70.
53. Fox CJ, Danska JS. IL-4 expression at the onset of islet inflammation predicts non destructive-insulinitis in diabetic mice. *J Immunol* 1997; 158: 2414-24.
54. Falcone M, Sarvetnick N. Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 670-6.
55. Adamson TC 3rd, Fox RI, Frisman DM, Howell FV. Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjögren's syndrome using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983; 130: 203-8.
56. Fox RI, Kang H-I, Ando D, Abrams J, Pisa E et al. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1994; 152: 5532-9.
57. De Vita S, Dolcetti R, Ferraccioli G, Pivetta B, De Re V, Gloghini A et al. Local cytokine expression in the progression toward B cell malignancy in Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1995; 22: 1674-80.
58. Kim WU, Min SY, Cho ML, Youn J, Min JK, Lee SH et al. The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 175-81.
59. Bucht A, Larsson P, Weisbrot L, Thorne C, Pisa P, Smedegard G et al. Expression of interferon-gamma (IFN-g), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-b) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 357-67.
60. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 397-440.
61. Ferraccioli G, Falletti E, De Vita S, Di Poi E, Damato R, Casatta L et al. Circulating levels of interleukin 10 and other cytokines in rheumatoid arthritis treated with cyclosporin A or combination therapy. *J Rheumatol* 1998; 25: 1874-9.
62. Al-Janadi M, Al-Dalaan A, Al-Balla S, Raziuddin S. CD4+ T cell inducible immunoregulatory cytokine response in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 23: 809-14.
63. Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS et al. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 1: 96-104.
64. Partsch G, Wagner E, Leeb BF, Broll H, Dunky A, Smolen JS. T cell derived cytokines in psoriatic arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 691-3.
65. Ritchlin C, Haas-Smith SA, Hicks D, Cappuccio J, Osterland CK, Looney RJ. Patterns of cytokines production in psoriatic synovium. *J Rheumatol* 1998; 25: 1544-52.
66. Malfait AM, Butler DM, Presky DH, Maini RN, Brennan FM, Feldmann M. Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 377-83.
67. Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, Nagaoka T, Hamaguchi Y, Nishijima C et al. Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 2838-42.