



Diferenciació funcional Th17 en l'expressió fenotípica i evolució clínica de l'arteritis de cèl·lules gegants. Rol de l'axis IL23/IL-17 en la inflamació vascular

Georgina Espígol Friigolé

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Diferenciació funcional Th17 en l'expressió fenotípica i
evolució clínica de l'arteritis de cèl.lules gegants.**

Rol de l'axis IL23/IL-17 en la inflamació vascular

TESI PRESENTADA PER
GEORGINA ESPÍGOL i FRIGOLÉ
PER TAL D'OPTAR AL
GRAU DE DOCTOR EN MEDICINA

**FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Febrer 2012

ÍNDEX

PÀGINES

AGRAÏMENTS.....	3-7
INTRODUCCIÓ.....	8-51
ARTERITIS DE CÈL.LULES GEGANTS.....	8-31
CITOCINES A ESTUDI.....	32-51
HIPÒTESI.....	52-53
OBJECTIUS.....	54-55
MATERIAL I MÈTODES.....	56-65
RESULTATS.....	66-105
DISCUSSIÓ.....	106-118
CONCLUSIONS.....	119-120
BIBLIOGRAFIA.....	121-142

AGRAÏMENTS

Ja fa dies que dono voltes al fet que en algun moment havia d'escriure un dels apartats més llegits de qualsevol tesi: els agraïments. I no serà tasca fàcil, perquè són moltes les persones que d'alguna manera o altre, sovint sense ser-ne conscients, m'hauran ajudat a arribar fins aquí.

Aquesta història comença just abans d'acabar la residència a l'antic despatx de la Mariona, bé, en aquell moment potser era una mica més la Dra. Cid i una mica menys la Mariona...Recordo que quan ella em va preguntar quines eren les meves motivacions per trucar a la seva porta, li vaig respondre que creia que a la vida hi pot haver una mica de temps per tot, que durant els anys de residència m'havia format bé per veure pacients, però que entenia la medicina com alguna cosa una mica més àmplia i que tenia curiositat per saber i entendre què era això de la recerca. Des d'aleshores ha plogut molt i crec que hem recorregut un llarg camí plegades. La Mariona pels qui no la conegueu gaire a banda de ser la meva directora de tesi, és una persona que desperta entusiasme amb tot el que fa, és engrescadora, d'esperit optimista i plena d'idees. Durant aquests anys he tingut el privilegi i l'ocasió de conèixer-la més d'aprop i puc garantir que la mateixa saviesa que demostra resolent un cas d'un pacient complicat o escrivint un article novedós també és present en el seu dia a dia personal. Evidentment el meu primer agraïment és doncs per la Mariona, perquè aquesta tesi i tot el que m'ha succeït en els darrers anys no hagués estat possible sense ella.

Des de que tinc memòria he volgut ser metge. I em sento afortunada per tenir-ho tan clar i viure la meva professió com una vocació. Però reconec que aquí no hi he arribat tota sola. Moltes són

les persones que al llarg de molts anys han contribuït a ensenyar-me “a fer de metge”. Sant Pau va ser la meva primera escola i la Dra Mireia Puig un referent. Amb la Mireia vaig aprendre moltes coses com ara que no tot és als llibres i que per ser un bon metge cal tenir una metodologia que no significa només seguir protocols, sino com deia ella “aprendre a pensar”. La Mireia és a més responsable del meu primer contacte amb la recerca ja que gràcies a ella i al Dr. Ballester, vaig fer la meva primera estada curta d’un mes en un laboratori de Philadelphia on el Dr Jagat Narula estudiava apoptosi cardíaca. La Mireia ha estat i és: mestre, amiga i sovint àngel de la guarda.

De la meva època a St. Pau també donar les gràcies al Dr. Emilio Ortega. Aleshores resident de quart any d’endocrinologia. En l’actualitat també li he de donar les gràcies per fer-me riure en èpoques dolentes.

La meva segona i gran escola: l’Hospital Clínic. Des dels adjunts de medicina interna, residents de les altres especialitats on vaig rotar, infermeres, administratives i treballadores socials seria molt llarg enumerar tots els que han contribuït a la meva formació. Bons i dolents de tots he après alguna cosa. Però alguns destaquen en nom propi. En primer lloc el Dr. Josep M Grau amb qui a part de trobar-hi un molt bon metge i haver après d’ell, allò que la Mireia Puig en deia “aprendre a pensar”, hi he trobat un bon amic que no ha dubtat en ajudar-me en cada ocasió que ha tingut. I dels adjunts de medicina un agraïment especial al Dr Àlex de la Sierra, Dr Jordi Casademont i Dr Cesc Cardellach. No em voldria deixar les Urgències, on vaig compartir guàrdies amb tres grans mestres: Ernest Bragulat, Gerard Espinosa i Jota Alonso. La Carme Queralt neix a Urgències i fins a dia d’avui que no m’ha abandonat.

Però els que sobretot es convertien en el teu salva-vides els primers anys d'aprenentatge i als qui segurament mai no agrairé prou que sempre hi fossin, són els residents grans. Donar les gràcies a en Francesc Fatjó perquè sense cap mena de dubte va treure i segueix traient moltes coses bones de mi, a la Glòria Garcia per la seva paciència, sentit comú, amistat i per tot el que hem compartit i espero seguirem compartint, a en Pedro Castro per preocupar-se tant per mi, a en Joan Carles Trullàs pel seu sentit de l'humor i a en Victor Gil per les nostres escapades en bici després de les guàrdies. Un record molt especial per a en Ramon Mora a qui malauradament ja no puc agrair res personalment. I evidentment a la Sira i a la incondicional Bea. El Clínic sense la Bea no hagués estat el mateix. Li vull donar les gràcies pel seu suport en tot moment i per tot el que hem viscut plegades. I em queda l'Aitor Alquézar, el meu company de promoció més estimat i bon amic més enllà de la medicina.

Dins el Clínic vull donar les gràcies a la petita família de l'AVI. L'AVI ha significat una gran escola de la vida. Durant els meus anys de guàrdia a la unitat m'he hagut d'enfrontar a situacions complicades i pacients difícils però sempre he comptat amb el Dr Nicolás, en Pedro, l'Anna i un magnífic equip d'infermeria. En Nico em va transmetre una altra gran concepte: "avançar-se al malalt". Sovint veure'l treballar ha estat un privilegi. L'Anna la meva mare-amiga.

Aquesta tesi no hagués estat possible sense els meus companys del "grup de vasculitis". En primer lloc l'Ester Lozano, per no perdre mai el somriure i haver-me obert les portes del laboratori, en Marc Corbera pel seu bon tarannà i a l'Ester petita pel seu entusiasme i per haver donat l'empenta final. També les gràcies a en Sergio Prieto, a en Pepe Hernández a qui sempre li

estaré en deute per haver-me vingut a reclutar per formar part d'aquest grup de gent, i a l'Anna Garcia, modèstia i seny tot en un.

I abans de deixar el Clínic, dues persones més: en Santi Nogué i l'Òscar Miró, que em van introduir en el món dels abstracts i les publicacions.

I des del món Clínic cap als NIH (National Institutes of Health) a Bethesda. Agraïda d'haver pogut viure l'experiència americana en tots els sentits. Durant una mica més de dos anys la Dra Tosato m'ha permès treballar en un dels centres de ciència pioners a nivell mundial, sempre dic que vaig marxar com a metge i he tornat si m'ho permeten dir els meus companys, una mica biòloga. Donar les gràcies en primer lloc a la Marta Segarra, per tota l'ajuda dins i fora del lab. A en Peter i a la Paola, sense ells no hagués estat el mateix, van ser allà en els moments més complicats i a més tinc la sort que la vida ara els ha dut cap a Barcelona. A l'Ombretta per la seva infinita paciència, a en Shuhei per tots els seus consells i perquè ha estat un privilegi treballar amb ell. A en Hide, a la Inn-Inn i a la Dra Tosato per ensenyar-me què vol dir perseverar. Fora del lab també vull donar les gràcies a l'Elsa, l'André, la Reini, la Patri, en Raimon, la Nuria, en Richard, en Santi, l'Olga, en Larry i l'Annette. Sense ells la tesi potser seria la mateixa...però jo no.

Donar les gràcies també als meus amics de tota la vida per la seva incondicionalitat. En Miquel, en Bernat, la Laia, la Sílvia i en Jordi. Menció especial a en Xevi Aldeguer per la seva visió de les coses. I a l'Aritz per entendre'm sempre.

A en Salva, per haver estat part essencial dels dos darrers anys de la meva vida i perquè m'ha fet el millor dels regals.

I per últim però no per això menys important, més aviat el contrari, a la meva família. On hi compto la Marina, per a qui no tinc paraules per agrair-li tot el que ha fet i fa cada dia per mi. Als meus avis i als meus tius perquè sempre hi són. A la Carla, per ser l'alegria de casa. A la Marta perquè sense ella la meva etapa a Washington i moltes altres coses no haguessin estat possibles.

Al pare i a la mare perquè a ells els ho dec tot. Ells m'han fet el que sóc i com sóc.

Les gràcies a la meva àvia Estrella, que va morir fa poques setmanes. Que soni com un petit homenatge. Per estimar-me tant i haver-me deixat volar lliure, sense cap egoisme personal.

I finalment a l'Adrià, a qui encara no he vist la carona, però que ja és el motor de la meva vida.

INTRODUCCIÓ

ARTERITIS DE CÈL.LULES GEGANTS

L'arteritis de cèl.lules gegants (ACG) és una vasculitis granulomatosa que afecta a artèries de mitjà i gran calibre amb una predilecció especial per les branques de la caròtida.

La seva primera descripció clínica va ser l'any 1890 però no va ser fins el 1932 quan Horton et. al van descriure la seva histologia com arteritis granulomatosa dels vasos temporals. És una malaltia pròpia de la tercera edat i la més comú de les vasculitis primàries (*Salvarini 2002*).

Aproximadament entre un 15-18% de pacients presenten complicacions isquèmiques irreversibles derivades de la oclusió vascular. S'han identificat complicacions tardanes com alteracions estructurals aòrtiques en el 18-22% d'aquests pacients i com a mínim entre un 5-15% desenvolupen estenosis simptomàtiques de grans vasos. La malaltia acostuma a respondre inicialment de manera satisfactòria al tractament amb glucocorticoids (GC) tot i que sovint els pacients requereixen un tractament prolongat i a vegades indefinit amb la iatrogènia que aquest fet comporta (*Cid 2007*).

Epidemiologia

La seva incidència anual varia segons les àrees geogràfiques essent en diferents països europeus de 6-23 casos per 100.000 habitants d'edat superior als 50 anys. En la nostra institució es

diagnostiquen entre 18-20 casos nous a l' any. Estudis autòpsics suggereixen que l' ACG està infradiagnosticada essent més freqüent del que clínicament es manifesta. Les dones es veuen més afectades que els homes i el factor de risc més important és l' edat, presentant-se en majors de 50 anys i augmentant la seva incidència entre els 70 i 80 anys.

En els darrers anys la incidència de l' ACG sembla haver augmentat, en part per l' envelliment de la població però també probablement per una millor identificació dels casos.

La mortalitat d' aquests pacients és l' esperada per edat i sexe essent pocs els casos reportats en la literatura com a fatals. De tota manera s' ha de tenir en compte l' elevat risc de mortalitat que complicacions com els aneurismes d' aorta o els infarts cerebrals poden tenir i que a vegades donada l' edat dels pacients, ja de per si amb risc de patir complicacions vasculars, en absència de confirmació histopatològica o tècniques d' imatge que permetin diferenciar-ho, es fa difícil relacionar-ho amb l' ACG (*Salvarani 2004, Nordborg 2003*).

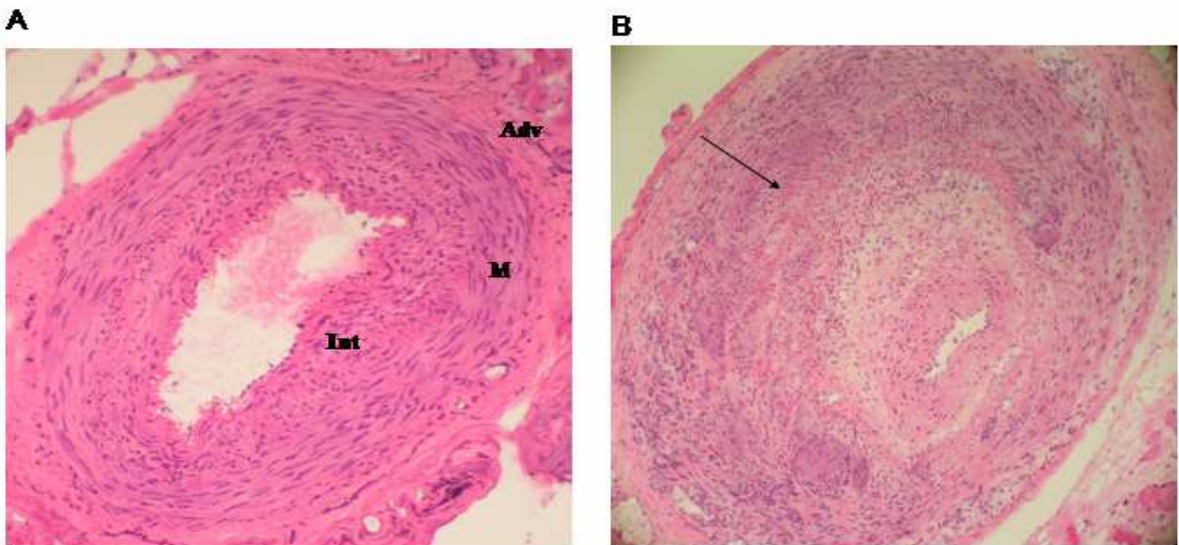
Etiopatogènia

Es desconeix la causa de l' ACG i es creu que múltiples factors genètics i ambientals poden influir en la susceptibilitat i forma de presentació de la malaltia. L' associació genètica més habitualment estudiada és amb el complex HLA. Igual que en l' artritis reumatoide HLA-DRB1*04 i DRB1*01 són els al·lels associats a major susceptibilitat per PMR i ACG (*Cid 1988, Weyand 1994*). Existeixen evidències de que la major part de manifestacions clíniques i complicacions isquèmiques dels pacients, són atribuïbles als potents efectes biològics que les citocines i factors de creixement exerceixen sobre la paret vascular i també a distància originant

una resposta inflamatòria sistèmica (febre, pèrdua de pes, malestar general, anèmia i augment en la producció de proteïnes de fase aguda).

L'estudi dels patrons histològics de l'ACG, l'estudi immunofenotípic dels leucòcits infiltrants i l'expressió de molècules d'adhesió endotelial, suggereixen els petits vasos que envolten d'adventícia arterial (*vasa vasorum*), com a punt d'entrada de les cèl·lules inflamatòries. A aquest nivell es produeixen interaccions complexes entre l'endoteli d'aquests vasos i els leucòcits (*Cid 2000*). Els limfòcits i els macròfags activats produeixen citocines proinflamatòries (TNF α i IL-1) que indueixen l'expressió de molècules d'adhesió de l'endoteli vascular. Els factors de creixement indueixen l'angiogènesi i els vasos neoformats incrementen la superfície d'interacció amb les cèl·lules inflamatòries. Posteriorment l'infiltrat inflamatori progressa cap a la capa mitja on es dona la diferenciació granulomatosa i continua cap a la capa íntima després del trencament de la làmina elàstica interna.

Figura 1. Estructura de l'artèria temporal. L'artèria de l'esquerra, A, és una biòpsia normal amb les diferents parts de la paret vascular: La capa adventícia (Adv) no té estructura laminar i està formada per fibroblasts inserits en fibres de col·lagen, principalment I i III. La capa mitja (M) està formada per múltiples capes de cèl·lules musculars llises orientades concèntricament. La capa íntima (Int) separa la capa mitja de l'endoteli luminal i està formada per cèl·lules miointimals i matriu extracel·lular. Entre la capa mitja i la íntima es situa la làmina elàstica interna que s'observa com una estructura ondulada. L'artèria de la dreta (B) és una biòpsia que correspon a un pacient amb diagnòstic d'arteritis de cèl·lules gegants. En la fotografia es pot veure com l'infiltrat inflamatori (fletxa), procedent de la capa adventícia, s'acumula en la zona d'unió íntima-mitja. En l'artèria patològica també s'observa la hiperplàsia de la capa íntima que obstrueix la llum vascular.



Segons es dedueix de diferents treballs sobre aquesta patologia, la reacció inflamatòria de l'arteritis de cèl·lules gegants sembla originar-se com a conseqüència d'una resposta immune adaptativa contra encara un no identificat antígen present a la paret arterial. Malgrat s'ha detectat RNA de Parvovirus B19 o de *Chlamydia pneumoniae* a la paret arterial, no s'ha pogut relacionar de forma causal amb la malaltia (*Helweg-Larsen 2002*). Aquesta hipòtesi es basa en diferents dades experimentals que inclouen la detecció a les lesions de cèl·lules dendrítiques activades i de cèl·lules T CD4 positives oligoclonals i també la interrupció dels infiltrats inflamatoris en empelts d'artèries temporals en ratolins amb immunodeficiència severa combinada (SCID) amb l'ús d'anticossos monoclonals anti-cèl·lules dendrítiques (*Ma-Krupa, 1994*).

S'ha vist que a l'adventícia de les artèries temporals normals existeix una població de cèl·lules dendrítiques immadures que requereixen ser activades per madurar i actuar com a cèl·lules presentadores d'antígen (*Weyand 1994*). Els Receptors tipus Toll (TLRs) s'han detectat en artèries temporals, particularment TLR2, TLR4 i TLR8 (*Pryshchep 2008*). Aquests receptors són una família de proteïnes transmembrana tipus 1 que amb el reconeixement de determinats patògens estimulen la resposta immunològica per diverses vies. S'ha demostrat que activen la via NFκ-B per exemple, regulant l'expressió de determinades citocines com IL-1, IL-8, TNFα o IL-12. Els TLR4 s'activen amb lipopolisacàrids (LPS) de la paret microbiana donant lloc a la inducció del fenotip madur de les cèl·lules dendrítiques amb l'expressió de CD86 (*Ma-Krupa 2004*). L'activació d'aquestes cèl·lules dendrítiques sembla ser un primer pas molt inicial en la resposta immunològica adaptativa que es produeix a posteriori. S'ha vist que els TLR4 també poden tenir lligands endògens. MRP8, una proteïna alliberada pels primers fagòcits que arriben a la zona inflamatòria, pot funcionar com a lligant dels TLR4 (*Vogl 2007*). En les lesions de l'

ACG s'ha detectat precisament l'expressió de MRP8 pels leucòcits que envolten els *vasa vasorum* adventicials indicant-ne un reclutament recent i s'ha trobat com un dels gens augmentats tant en les artèries temporals dels pacients respecte els controls, com dels pacients que presenten una evolució amb més rebrots de la malaltia (Foell 2004).

Activació de les cèl·lules T: Els infiltrats inflamatoris de l'ACG bàsicament es componen de cèl·lules T CD4 i macròfags (Weyand 2003). Els leucòcits arriben a la zona d'inflamació atrets per quimiocines secretades a nivell de les lesions vasculares. Les quimiocines inclouen una varietat de polipèptids amb activitat quimiotàctica actuant a través de receptors específics. S'han descrit quatre famílies de quimiocines (segons la posició relativa del seu residu de cisteïna característic): C, CC CXC i CX3C (Bromley 2008) . Diversos treballs han estudiat varies quimiocines que s'expressen en l' ACG. En aquest sentit s'ha vist com CCL2/MCP-1 que és activa sobretot atraient limfòcits Th1 i monòcits és clau en la inflamació vascular, és produïda no només per cèl·lules inflamatòries i endotelials sino també per les cèl·lules musculars llises i es troba elevada en pacients que presenten rebrots de la malaltia. De fet, l'expressió de CCL2/MCP-1 en el moment del diagnòstic s'ha relacionat amb la possibilitat de rebrots, més durada del tractament i major dosi acumulada de corticoides (Cid 2006). Altres quimiocines i receptors que es detecten en l' ACG són CCR5, CXCR3, i CCL5/RANTES. Els lligands del receptor CXCR3 són CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10) i CXCL11 (ITAC), tots ells induïts en diversos tipus cel·lulars incloses cèl·lules endotelials per l'IFN γ (Bruhl 2005).

Els leucòcits circulants un cop atrets i activats pels agents quimiotàctics infiltren la paret arterial a través de complexes interaccions amb les cèl·lules endotelials dels *vasa vasorum* de

l'adventícia, dels neovasos i de la matriu subjacent. Aquestes interaccions són mitjançades per molècules d' adhesió. D'entre elles, les integrines leucocitàries són una peça fonamental per assegurar una ferma adhesió a les cèl·lules endotelials que permetrà la posterior transmigració i la progressió cap a la membrana basal. Les cèl·lules endotelials contribueixen a la perpetuació de les lesions mitjançant l'expressió de quimiocines (CXCL8/IL8, CCL2/MCP-1) i molècules d'adhesió (ICAM-1, ICAM-2, VCAM, PECAM-1...) pels leucòcits i d'altra banda contribueixen a la resposta inflamatòria sistèmica a través de la producció de citocines (IL-1 i IL-6) (*Pober 2007, Cid 2000.*)

La integrina VLA4 Integrin alpha4 beta1 (Very Late Antigen-4) es troba fortament expressada en els limfòcits infiltrants a les lesions de l'ACG i a més es co-localitza amb VCAM-1, el seu receptor a nivell de les cèl·lules endotelials dels *vasa-vasorum* (*Cid 2000 bis*).

Activació dels Macròfags: D'acord amb la diferenciació funcional tipus Th1 , els limfòcits CD4 que infiltren la paret del vas produeixen IFN γ , citocina fonamental en l'activació i migració de macròfags així com en la inducció de la seva diferenciació granulomatosa característica de la malaltia (*Weyand 1994*).

Els macròfags i limfòcits activats produeixen gran quantitat de citocines inflamatòries, especialment IL-1, IL-6 i TNF α . Aquestes citocines tenen efectes locals i sistèmics. En aquest sentit diversos treballs del nostre grup han contribuït a caracteritzar millor la presentació i l'evolució d'aquesta malaltia en els diferents pacients. Hem vist que els pacients amb una resposta inflamatòria sistèmica més important tenen majors nivells circulants de les citocines

pro-inflamatòries IL-6 i TNF α i també les seves artèries expressen més IL-6, TNF α i IL-1 β (Hernandez-Rodriguez 2004). Aquests pacients presenten menys fenòmens isquèmics i a la vegada cursen amb una malaltia més resistent al tractament (Cid 1998, Hernandez-Rodriguez 2002). Els macròfags activats també produeixen metaloproteases i òxid nítric, que donen lloc a la destrucció de la paret vascular. De forma paral·lela es posen en marxa mecanismes de reparació vascular a través de la secreció de factors de creixement i factors angiogènics com el factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF) i el factor de creixement endotelial vascular (VEGF). El conjunt d'aquests mecanismes condueix a la destrucció de la làmina elàstica interna i hiperplàsia de la íntima, que és la principal responsable de la disminució de la llum vascular.

Angiogènesi: La neo-vascularització és present en les lesions de l' ACG i s'hi han detectat tant factors angiogènics (VEGF, FGF-2, angiogenin, IL-6) com anti-angiogènics (IFN γ , IP-10) (Kaiser 1999). L'angiogènesi juga un rol important en les malalties inflamatòries facilitant el reclutament de cèl·lules inflamatòries i com a font de citocines i quimiocines que ajudaran a perpetuar la inflamació. Molts factors angiogènics, inclosa la hipòxia, poden contribuir a la formació de nous capil·lars (Cid 2000, Szekanecz 2007). En l' ACG l'activitat angiogènica en sèrum i teixit s' ha associat a una baixa prevalença de complicacions isquèmiques (Cid 2002).

També un més alt nivell d' IL-6 en sèrum i en les lesions (mRNA i proteïna) s'ha relacionat amb una més baixa prevalença de complicacions isquèmiques. L'acció angiogènica de la citocina IL-6 explicaria, al menys parcialment, el seu efecte protector enfront de fenòmens isquèmics. En contrapartida, la formació de neovasos contribuiria a la perpetuació i amplificació de la inflamació (Hernandez-Rodriguez 2003).

Oclusió vascular: causa de les complicacions isquèmiques, es produeix probablement a conseqüència de la resposta vascular a mediadors produïts durant el procés inflamatori. En l'ACG a diferència d'altres vasculopaties inflamatòries es produeix com a resultat d'una hiperplàsia i fibrosi de la túnica íntima (*Weyand 2003*).

En l' ACG la capa muscular es veu ocupada per infiltrats inflamatoris amb reemplaçament de les cèl·lules musculars llises per teixit fibrós. Proteases amb activitat elastinolítica incloses metaloproteinases MMP2, MMP9 i MMP12 són activades per les cèl·lules inflamatòries tenint la seva màxima activitat proteolítica al voltant de la làmina elàstica interna (*Segarra 2007*). S'ha demostrat que macròfags infiltrants produeixen factors de creixement amb capacitat fibrogènica, estimulen el creixement de les cèl·lules miointimals, la seva migració i la producció de matriu. Són entre altres PDGF, EGF, TGF β i IL-1 β i estudis preliminars suggereixen que aquests factors podrien contribuir a la oclusió dels vasos (*Kaiser 1998*). El PDGF β podria tenir un paper destacat en aquest sentit ja que s' ha vist és un dels majors estímuls en induir la proliferació i la migració de les cèl·lules miointimals. La seva inhibició amb Imatinib mesylate s' ha demostrat capaç de reduir les respostes mediades pel PDGF β en artèries cultivades ex-vivo procedents de pacients amb ACG (*Lozano 2008*).

Manifestacions Clíniques

a) Síntomes cranials

Las manifestacions cranials combinades són la forma més freqüent de presentació.

La **cefalea** és probablement el símptoma més freqüent, descrit en dues terceres parts dels pacients. Sovint refractari al tractament analgèsic i localitzat en las zones temporal i/o occipital.

La **hipersensibilitat del cuir cabellut** sovint també es localitza a la zona temporal pero es pot presentar de forma difusa. No és extrany que coincideixi amb els pacients que presenten cefalea. A l'exploració física les branques frontals i parietals superficials de l'artèria temporal poden palpar-se engruixides, nodulars i ocasionalment eritematoses amb pulsos disminuïts o absents.

La isquèmia produïda per la reducció del fluxe sanguini es responsable d'alguns símptomes com la **claudicació mandibular** present en la meitat dels pacients i considerat patognomònic per alguns autors. També tot i que menys freqüent, pot aparèixer dolor a la llengua, cara o coll; edema i tumefacció facial o disfàgia dolorosa. No són rares les manifestacions otorrinolaringològiques (10% dels pacients) com l'odinofàgia , l'otàlgia, la tos irritativa o el vertígen. L'odontàlgia ha motivat més d'una visita a l'odontòleg sense èxit en la seva resolució.

Diferents combinacions d'aquests símptomes amb intensitats variables fan que la forma de presentació de la malaltia sigui múltiple, variada i a vegades difícil de sospitar (*Weyand 2003*).

La **pèrdua de visió** parcial o completa es troba en un 15-20% dels pacients essent la més freqüent de les complicacions isquèmiques i sovint la primera i a vegades la única manifestació de la malaltia (*Gonzalez-Gay 2005*).

Normalment no és dolorosa i si no es tracta, en més del 50% dels casos l'altre ull es pot veure afectat en el període d'una o dues setmanes. Una vegada establerta, la pèrdua de visió acostuma a ser permanent. La pèrdua de visió és causada per la isquèmia del nervi òptic com a resultat d'arteritis en les branques de les artèries oftàlmica o ciliars posteriors en el 80-90% dels casos o de forma menys freqüent per la oclusió de les branques de l' artèria central de la retina en el 10% (*Foroozan 2003*). En el fons d'ull es detectarà una neuritis òptica isquèmica amb pal·lidesa i edema en el disc òptic que es pot acompanyar de petites hemorràgies "en estella". Malgrat no hi ha estudis que ho suportin, els glucocorticoids són altament eficaços en la prevenció de la pèrdua de visió de manera que les complicacions isquèmiques de la malaltia s' han reduït del 60% en l' era pre-esteroidea al 15-20% actual (*Hunder 2006, Hayreh 2002*).

Malauradament la única forma que es coneix efectiva per reduir el dany vascular irreversible és el diagnòstic precoç, fet que sovint es veu dificultat ja que aparentment almenys un subgrup de pacients presenten la pèrdua de visió com a primera i única manifestació de la malaltia (*Lozano 2008*).

L'**amaurosis fugax** és un important símptoma visual que precedeix la pèrdua de visió permanent en un 44% dels casos. La diplopia o les al.lucinacions visuals tenen lloc de forma menys freqüent.

b) Síndrome inflamatòria sistèmica

Els símptomes sistèmics es presentaran aproximadament en la meitat dels pacients. La febre (que pot arribar a 39-40°C en un 15% dels pacients) pot ser la única forma de presentació clínica. L'anorèxia, astènia i pèrdua de pes progressiva poden ser detectats. Estudis entre els que destaquen els del nostre grup, han posat de manifest que els malalts que presenten una resposta inflamatòria sistèmica intensa amb febre, pèrdua de pes, anèmia i elevació dels reactants de fase aguda, tenen un risc molt baix de complicacions isquèmiques cranials. Per altra banda però, requereixen un tractament més prolongat rebent dosis acumulades de corticoides superiors. (*Hernández-Rodríguez 2003*).

c) Arteritis de grans vasos

En els darrers anys han augmentat els casos clínics i les petites sèries de pacients amb ACG que presenten complicacions vasculars com aneurismes d' aorta, isquèmia d' extremitats o infarts cerebrals. Essent en alguns casos la primera manifestació de la malaltia. L'extensió i freqüència de l'afectació vascular en l'ACG no està ben delimitada. En els darrers anys l'accés a les noves tècniques d'imatge conjuntament amb una major expectativa de vida i un seguiment més llarg dels pacients, està modificant el nostre coneixement en aquest sentit (*Cid 2009*).

En primer lloc destacar les similituds i diferències entre la ACG i l' arteritis de Takayasu (AT), les dues vasculitis que clàssicament afecten grans vasos. Ambdues són vasculitis granulomatoses en principi ben definides. L'AT es una patologia bàsicament vaso-oclusiva i que afecta les

branques de l' aorta, generalment diagnosticada en gent jove, la majoria dones per sota dels 50 anys i essent més prevalent en el continent asiàtic . L'ACG per la seva banda s' identifica pels seus símptomes cranials i sistèmics (*Maksimowicz-McKinnon1998*).

En l'ACG entre un 5-15% dels pacients presenten estenosis de grans vasos, especialment de les artèries subclàvia y axil·lar (*Weyand 2003*).

El símptoma associat més freqüent és la claudicació dels braços, podent existir parestèsies perifèriques i ocasionalment gangrena. En l'exploració física destaca una disminució o absència dels polsos en les extremitats superiors i en el coll i l' auscultació de bufos en els diferents territoris amb artèries afectades. Sovint l'absència de símptomes cranials d' aquests pacients, la biòpsia negativa de la temporal i la seva similitud amb l' arteritis de Takayasu, dificulten el diagnòstic que en la majoria de casos es realitzarà mitjançant proves d' imatge vascular.

Aorta

L' afectació de l' aorta i les seves branques en pacients amb ACG va ser detectada en necròpsies a finals dels anys 1930 i a principis dels 40 (*Ostberg 1972*). Estudis retrospectius demostren una més alta prevalença dels aneurismes d' aorta en els pacients amb ACG que en la població general (9.5-18%) (*Evans 1995, Gonzalez-Gay 2004*). Un estudi prospectiu realitzat pel nostre grup amb 54 pacients i un seguiment de 5.4 anys, va demostrar una prevalença del 22.2% (*Garcia-Martinez 2008*). Com apuntava a l' inici de l' apartat val a dir que l' avanç en les tècniques d' imatge ha permès aprofundir en el coneixement d' aquesta patologia de manera que en l' actualitat mitjançant el PET i la seva capacitat de detectar fluorine-deoxyglucose (FDG) es pot

captar activitat metabòlica suggestiva d' inflamació a la paret arterial (*Blockmans 2009*). En aquest sentit, un estudi recent realitzat pel nostre grup mitjançant la TC amb angiografia detecta *aortitis* definida com un engruiximent de la paret arterial concèntrica de més de 2 cm sense presència d' arteriosclerosi en el 80% dels pacients en el moment del diagnòstic. (*Prieto-González 2012*).

La mortalitat d' aquests pacients per una complicació aòrtica (aneurisma, dissecció o insuficiència valvular) per tan es veu incrementada respecte la població general (*Evans 2003*). Ja que aquestes complicacions poden resultar greus, es creu convenient la realització de TC o RM que poden detectar signes d'aortitis en fases precoces de la malaltia.

d) Manifestacions neurològiques

Presentes en aproximadament un 30% dels pacients. Les més freqüents són la neuropaties que inclouen des de la mononeuropatia a polineuropaties perifèriques de les extremitats. Menys comuns però sovint més greus són els infarts cerebrals o els accidents isquèmics transitoris que poden afectar el territori de las caròtides i de las artèries vertebrobasilars (*Solans-Laque 2008*).

e) Polimiàlgia Reumàtica

Pacients de 50 o més anys amb dolor bilateral a la cintura escapular es poden classificar de PMR en la presència de rigidesa matutina de > 45 min, elevació de PCR/VSG i dolor en la cintura

pèlvica en absència de sinovitis perifèrica o serologia positiva per artritis reumatoide (AR) (*Dasgupta 2011*).

La PMR i l'ACG són dues entitats estretament relacionades. Afecten a pacients amb el mateix rang d'edat, comparteixen els gens de risc i presenten elevació dels reactants de fase aguda de forma similar. Hi ha qui apunta que podria tractar-se de dues formes diferents d'una mateixa patologia. Els símptomes de la PMR s'observen entre el 40-60% dels pacients amb ACG, podent aparèixer abans, de forma simultània o posteriorment al diagnòstic d'arteritis. En canvi només un 10% de pacients amb símptomes exclusius de PMR acabaran essent diagnosticats d'ACG. Per aquesta raó es considera recomanable biopsiar únicament aquells pacients amb PMR que presenten algun símptoma cranial o signes d'anormalitat en les artèries temporals.

Altres alteracions musculoesquelètiques que podem trobar en l'ACG són artritis perifèriques i tumefacció i edema de mans i/o peus (*Hernández-Rodríguez 2009*).

Dades Analítiques

La velocitat de sedimentació eritrocitària (VSG) superior a 50mm/h és un dels criteris inclosos dins la classificació d'ACG del American Collage of Rheumatology. No obstant, un 22.5% de los pacients (sobretot els que presenten manifestacions isquèmiques) tenen una VSG normal abans del tractament. La proteïna C reactiva (PCR) pot ser un indicador amb major sensibilitat per a la detecció de malaltia activa. Tot i així la normalitat dels valors de la VSG o de la PCR no exclouen el diagnòstic d'ACG ni de recaiguda si la clínica és compatible.

Altres troballes habituals són l'anèmia normocítica normocròmica, la trombocitosi i en una tercera part dels pacients, l'elevació dels paràmetres de funció hepàtica particularment de la fosfatasa alcalina. El factor reumatoide i els anticossos antinuclears normalment són negatius (*Salvarani 2002*).

Diagnòstic

El diagnòstic definitiu requereix biòpsia de l'artèria temporal i anàlisi histològic. La biòpsia es recomana en tots els casos de sospita d'una ACG. Degut a que la inflamació vascular és discontinua es recomana l'obtenció d'un segment d'artèria d'entre 3-5 cm. Es calcula que un 10% dels pacients tindran una biòpsia negativa. Si la sospita és molt alta i una primera biòpsia ha estat negativa es pot plantejar la realització d'una segona biòpsia a l'artèria contralateral.

Assegurar el diagnòstic és important de cara a un possible tractament crònic amb corticoides i els efectes secundaris que se'n deriven. Una qüestió important i que sovint es pot plantejar el metge que atén a Urgències o a la consulta per primera vegada un pacient amb alta sospita d' ACG, és la necessitat d'iniciar tractament abans de la realització de la biòpsia. Es considera com a més adequat enviar al pacient a algun centre de referència on es practiquin biòpsies sense retards i sense tractament, ja que aquest pot modificar el resultat de la biòpsia, però si això no és possible, iniciar tractament quan la sospita sigui realment molt elevada o en pacients que hagin presentat pèrdua de visió ja sigui transitòria o persistent o altres fenòmens isquèemics (*González-Gay 2010*).

L'ecografia doppler s'ha proposat com a prova diagnòstica en l'ACG. Schmidt et al. descriuen un halo fosc al voltant de la llum arterial específic pel diagnòstic. No obstant altres estudis no han demostrat la superioritat de l'ecografia doppler respecte una meticulosa exploració física. Si la sospita és una ACG extracranial, les millors opcions seran proves d'imatge (TC, RM o arteriografia) (*Blockmans 2009*).

Tractament

El tractament es basa amb glucocorticoids (GC), guiat sobretot per resposta clínica i analítica. En general la resposta als mateixos acostuma a ser espectacular, millorant gran part de la simptomatologia de forma molt ràpida.

Malgrat no hi ha estudis que ho suportin, els glucocorticoids són altament eficaços en la prevenció de la pèrdua de visió. Els polsos intravenosos de GC es continuen utilitzant com a tractament sobretot per prevenir empitjoraments en els defectes de visió establerts, malgrat el baix nivell d'evidència. Dos estudis retrospectius van posar de manifest la disminució en la freqüència d'events isquèmics en pacients que prèviament al diagnòstic realitzaven tractament antiplaquetari (*Nesher 2004, Lee 2006*). Tot i que no hi ha conclusions definitives si s'extrapolen aquests resultats, el tractament amb aspirina d'aquest pacients sempre que no hi hagi contraindicacions pot semblar recomanable (*Lozano 2008*).

El tractament s'acostuma a iniciar amb 40-60 mg de prednisona o equivalent al dia durant les primeres setmanes. Aparentment no sembla haver-hi massa diferència entre el tractament oral o

els bolus de glucocorticoides en termes de prevenir la pèrdua visual (*Hayreh 2003*) . La reducció fins a la dosi de manteniment de 5 o 7.5 mg de prednisona al dia durant 8 o 12 mesos fins després del diagnòstic pot ser molt heterogènia (*Proven 2003*).

Aproximadament entre un 10-15% de pacients poden experimentar un deteriorament visual durant les primeres setmanes després de l'inici de la corticoteràpia (*Liu 1994*).

A més a més cal tenir present que malgrat el tractament amb corticoides, entre el 18-22% de pacients presentaran alteracions aòrtiques durant el seguiment i entre un 5-15% estenosis simptomàtiques dels grans vasos (*Bongartz 2006*).

L'espectre de manifestacions clíniques i l'evolució de la malaltia són molt variables d'un individu a un altre. Anant des de casos descrits a la literatura de remissió espontània (*Hernández-Rodríguez 2006*) fins a pacients que requeriran dosis elevades de prednisona de manera indefinida. En un 10-15% dels pacients la prednisona o equivalent, no pot ser reduïda per sota de 10-15 mg/dia sense aparició de rebrots o d'activitat subclínica persistent, pel que en aquests casos es considera afegir algun altre fàrmac immunosupresor. També s'ha observat que entre un 40-50% dels pacients que aconsegueixen disminuir la dosi de corticoides a nivells fisiològics no toleren la completa retirada del tractament abans d'un període de dos o tres anys (*Wilke 1995*).

Malgrat el tractament amb corticoids indueix una milloria simptomàtica molt important, no semblen suficients pel control d'alguns dels pacients i a més els efectes secundaris dels mateixos es detecten en un 86% dels pacients amb un seguiment a 10 anys (*Proven 2003*).

Per aquest motiu s'han buscat alternatives i en són un exemple els tres assaigs clínics multicèntrics amb metotrexat (*Hoffman 2002, Jover 2001, Spiera 2001*). L'eficàcia del metotrexat en aquests assaigs és controvertida, no obstant un recent meta-anàlisi dels mateixos, sembla indicar que el metotrexat pot reduir la possibilitat de rebrot comparat amb el placebo amb un efecte modest (*Mahr 2007*).

Pel que fa al remodelament vascular: els GC són molt actius en millorar les manifestacions clíniques i en reduir l'extensió de l'infiltrat vascular inflamatori després d'un tractament prolongat però malgrat el pas del temps, l'arquitectura del vas es manté alterada de forma important permetent el diagnòstic d'arteritis fins i tot anys després d'aconseguir la remissió (*Lie 1995*). Mentre sembla que els GC són bons millorant el component inflamatori de la malaltia no sembla que tinguin una clara influència en el procés de remodelació vascular (*Visvanathan 2008*).

Els mecanismes pels que l'ACG persisteix no estan clars, com tampoc quines són les vies inhibides pels GC. Per tot el que hem esmentat amb anterioritat, queda clar que els glucocorticoids no són capaços de suprimir completament l'activitat de la malaltia i que a més són font de iatrogènia important en molts pacients.

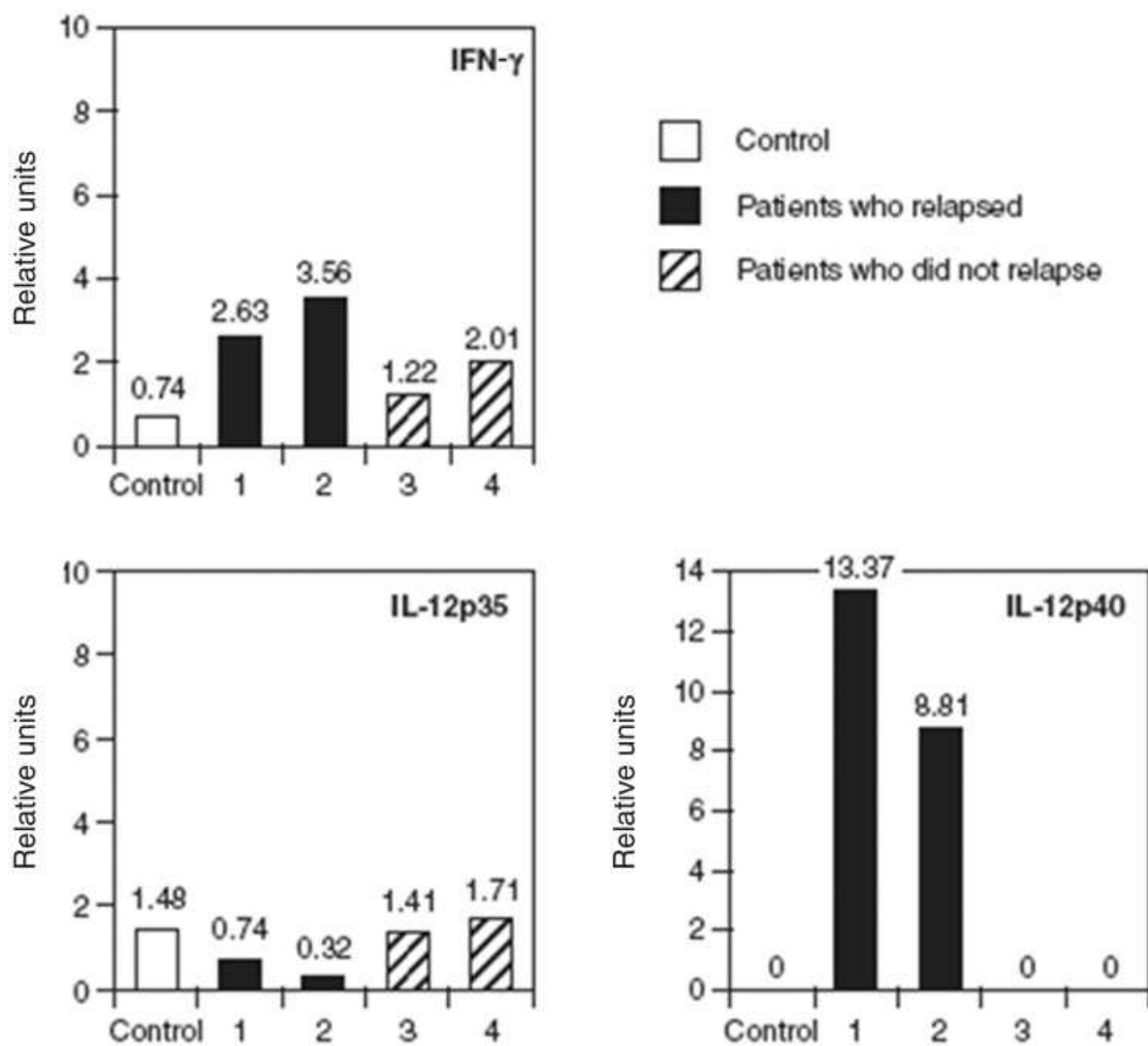
NOUS ENFOCS

Amb la finalitat de trobar tractaments alternatius a la corticoteràpia, en els darrers anys, s'han produït diverses aportacions al coneixement de les diferents respostes immunològiques que poden ser útils per dissenyar teràpies per malalties inflammatòries cròniques. En aquest sentit es va aprofundir en l'estudi del TNF α que indueix la secreció de citocines proinflammatòries (IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF), afavorint l'activació de cèl·lules T CD4 i la producció d'IFN γ que a la vegada incrementa la producció de TNF α . A nivell de l'ACG hi ha estudis on s'ha detectat que la concentració de TNF α en sèrum es troba incrementada en pacients que presenten una resposta sistèmica inflammatòria més important i que alhora són més resistents al tractament requerint dosis més altes de glucocorticoides i en temps més prolongats (*Hernandez-Rodriguez 2004, García-Martínez 2010*). Com a diana, el bloqueig del TNF α s'ha demostrat eficaç en gran varietat de malalties granulomatoses o malalties inflammatòries cròniques com en la malaltia de Crohn o l'artritis reumatoide (*Feldmann 2001*). Considerant aquests dos aspectes, d'una banda l'eficàcia provada en altres malalties i de l'altra la seva probable rellevància en l'ACG, es va idear un assaig clínic multicèntric randomitzat amb infliximab (anti-TNF α) per determinar l'eficàcia terapèutica i la seguretat del bloqueig del TNF α amb l'infliximab en pacients amb ACG.

Malauradament però, l'estudi, amb inclusió de 44 pacients de nou diagnòstic en tractament per remissió amb GC i que van rebre de forma randomitzada infliximab o placebo, no va mostrar evidència, almenys amb aquest grup de pacients, que l'infliximab fos útil com a tractament de manteniment (*Hoffman 2007*). Dins el context d'aquest assaig clínic, es va realitzar un estudi prospectiu longitudinal en el que es van analitzar els marcadors inflamatoris d'aquests pacients tan a nivell tissular com en sèrum. Mitjançant un sistema d'amplificació per RT-PCR de 90 gens

relacionats amb la resposta inflamatòria en les segones biòpsies d'aquests malalts realitzades al cap d'un any del seguiment, es va poder comprovar unes més altes concentracions de mRNA IL-12p40 i de mRNA IFN- γ en els pacients que presentaven més recaigudes que en els que responien bé al tractament. La IL-12p40 persistia elevada en pacients amb rebrots freqüents però indetectable en els que es trobaven en remissió. La IL-12p35 es trobava present en baixes concentracions en els pacients amb rebrots.

Figura 2. RT-PCR d'IFN γ , IL-12p35 i IL-12p40 de segones biòpsies en 4 pacients i un control 1 any després del diagnòstic i de l'inici del tractament. En destaca sobretot l'augment de la IL12-p40 en els pacients que presentaven mala evolució clínica en forma de rebrots, respecte els pacients en remissió. Adaptació figura de l'article: Visvanathan S, Rheumatology 2011.



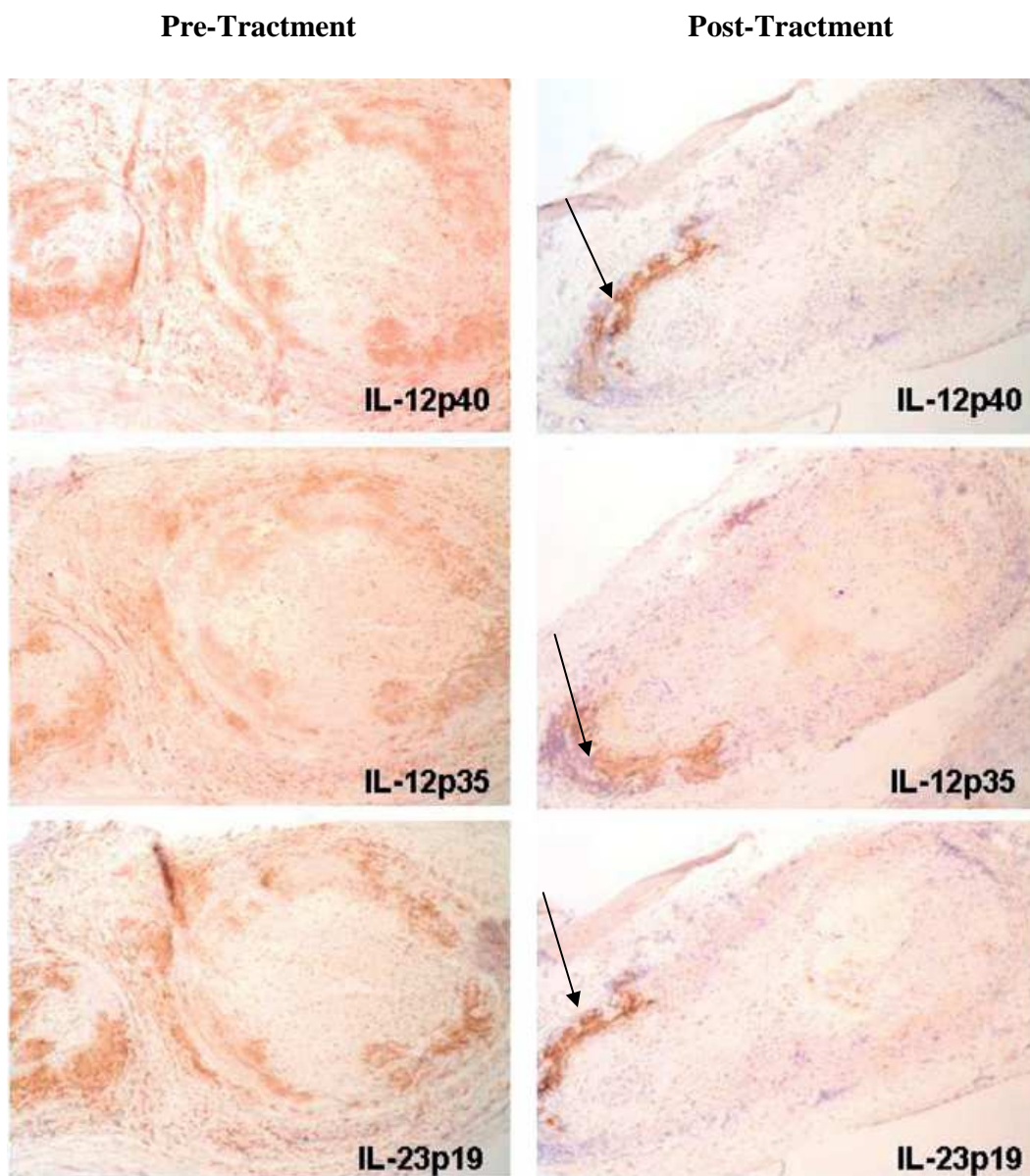
Aquest fet suggeria que la persistència de IL-12p40 podia estar relacionada amb la IL-23 (formada per les subunitats p40 i p19) més que amb la IL-12 (subunitats p40 i p35). La IL-23 no havia estat inclosa en els gens d'estudi. Per aquest motiu la IL-23p19 i la IL-17 (citocina relacionada) van ser analitzades per real-time PCR trobant-les sobre-expressades pre-tractament i presentant una clara davallada post-tractament. Malgrat altres mRNA es van trobar elevats, cap altre gen clarament es diferenciava entre els pacients que rebrotaven i els que no.

Es va estudiar l'expressió d'aquestes citocines mitjançant immunohistoquímica en les biòpsies obtingudes pre i post-tractament (Figura 3). La distribució topogràfica d'aquestes citocines mostra la seva disminució post-tractament i també la seva expressió en una àrea localitzada a nivell adventicial en un pacient amb rebrot clínic tal com mostren les fletxes de la figura. (*Visvanathan 2011*)

Amb aquest estudi per tan, es va veure clarament una conducta dissociada entre les dues subunitats de la IL-12 (p40 i p35) i en conseqüència la possible rellevància de la IL-23. Com a limitació per treure conclusions més rellevants, la inclusió de pocs casos (n=4).

Totes aquestes dades ens orienten a pensar que aquestes citocines: IL-12p40, IL-12p35, IL-23p19 i IL-17, poden tenir un paper rellevant en la inflamació inicial i persistència de la malaltia i poden ser objecte d'estudi més acurat.

Figura 3. Immunohistoquímica de IL12-p40, IL-12-p35 i IL-23-p19 en les biòpsies de l'artèria temporal del mateix pacient, en el moment del diagnòstic i un any després quan presentava un rebrot clínic. Tal com mostren les flexes en el moment del rebrot destaca la presència d'aquestes interleucines en una àrea adventicial de l'artèria. Adaptació figura de l'article: Visvanathan S, Rheumatology 2011.



CITOCINES A ESTUDI

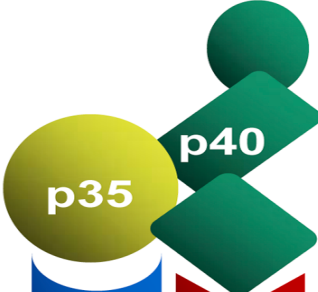







La família de la interleucina 12 (IL-12), està lligada evolutivament a la superfamília de la citocina IL-6. La família està composta fins a dia d'avui per IL-12, IL-23, IL-27 i la més recentment identificada IL-35 (*Collison 2007*).

Aquestes citocines són heterodímers composts per una cadena α (p19, p28 o p35) i una β (p40 o Ebi3). La cadena α té una estructura amb quatre espirals típica de citocines com la IL-6 o el factor estimulador de colònies (GM-CSF), mentre que la cadena β comparteix homologia amb les cadenes de receptors solubles de citocines (*Gubler 1991*).

La IL-12 és una proteïna formada per dues subunitats unides per un pont disulfur de 70 kDa compost per p40 i p35 (*Gately 1991*): la cadena p40 pot heterodimitzar amb p19 formant la IL-23 (*Oppmann 2000*). Més de 10 anys enrere es va identificar en cèl·lules B infectades pel virus Epstein-Barr una segona cadena β , Ebi3 (*Devergne 1996*) que juntament amb la p28 formen la IL-27 (*Pflanz 2002*). La IL-35 està composta per Ebi3 i la p35.

Pel nostre treball dins d'aquesta família ens centrarem sobretot en la IL-12 i la IL-23.

Figura 4. Esquema de les interleucines 12 i 23. Adaptat de Collison and Vignali. Immunol Rev 2008.

	IL-12	IL-23
Cytokines		
Receptors		
Kinases		
Vital STATs		
Also phosphorylated	STAT 1/3/5	STAT 1/5
Cells that Produce	DCs, monocytes macrophages, B cells	DCs, monocytes macrophages, B cells
Cells that Respond	Naïve T cells Th1 cells NK cells	Memory T cells Th1 & Th17 cells NK cells
Function	Th1 activation Th1 maintenance Blocks Th2	Th1 activation Th17 polarization & proliferation

Interleucina 12

La interleucina 12 (IL-12), també coneguda com a factor estimulants de cèl.lules Natural Killer (NKSF) o factor de maduració dels limfòcits citotòxics (NKSF), és una citocina pleiotròpica originalment identificada l'any 1989 en un cultiu de cèl.lules EBV-transformades RPMI-866 (*Kobayashi 1989*).

Tal com suggereixen els noms de les dues subunitats que formen la IL-12, p35 té un pes molecular de 35 kDa mentre que la p40 de 40 kDa. La p35 té set cisteïnes més tres potencials N-glicosilacions i la molècula es creu està altament glicosilada. La p40 conté 10 residus de cisteïna i quatre llocs potencials per N-glicosilacions (*Gubler 1991*). La subunitat p35 del ratolí presenta un 60% d'identitat amb la humana i la p40 un 70% (*Schoenhaut 1992*).

Expressió i Secreció

La IL-12 és produïda principalment per cèl.lules presentadores d'antigen (APCs), com macròfags, monòcits i cèl.lules dendrítiques (DCs) després de la seva activació pel reconeixement d'un patògen específic (*Ma 1996*).

La co-expressió de les cadenes α i β és necessària per la secreció de la citocina bioactiva, fet que sembla repetir-se en tots els membres de la família (*Wolf 1991*). La producció de la proteïna està limitada per l'expressió de la cadena α . La p35 s'expressa amb nivells més baixos que la p40 que en general es produeix en quantitats molt més grans del que requereix la formació de

l'heterodímer. I de fet, s'han descrit funcions pels p40 homodimers independents de la IL-12, com ara actuar d'antagonista de l'activitat de la mateixa IL-12 sense afectar la IL-23 (*Gillessen 1995*).

Una característica comuna per totes les cadenes α i β de la família és la seva expressió per part de les APCs en resposta als bacteris o els seus productes purificats. Tot i que no tota la família respon de la mateixa manera als mateixos patògens, l'estimulació de les DCs amb lligants dels TLRs com el lipopoliscàrid (LPS) indueix la producció de IL-12 (*Hochrein 2001*).

Receptor i senyalització intracel.lular

Per la senyalització d'IL-12, la subunitat IL-12p40 interactua amb IL12R β 1, mentre que la p35 amb IL12R β 2 (*Presky 1996*). Ambdós cadenes del receptor són necessàries tot i que tenen funcions independents. IL-12R β 1 té una gran afinitat per unir-se amb la IL-12 mentre que IL-12R β 2 serà requerit per la transducció de senyal a través de tres residus de tirosina (*Wu 2000*). Les dues cadenes s'expressen en les cèl.lules responedores a l'acció de la IL-12: cèl.lules T (sobretot després de ser activades), NK i DCs. Consistent amb el rol de la IL-12 de promoure la resposta Th1, l'IFN γ augmenta l'activitat de les T-bet portant a un augment de l'expressió de IL12R β 2 a la superfície permetent major resposta a la IL-12 (*Lighvani 2001*). De forma contrària la IL-4 redueix l'expressió d'aquesta cadena del receptor afavorint la desposta Th2 (*Szabo 1997*).

La unió de la IL-12 al seu receptor indueix la fosforilació de Jak2 i TyK2 (*Parham 2002*). STAT1, STAT3, STAT4, i STAT5 poden ser activats per IL-12, però només STAT 4 és crític i indispensable (*Bacon 1995*).

Funció

a) Inflammatory

La IL-12 és una citocina pro-inflamatòria necessària per la immunitat adaptativa i la diferenciació Th1 (*O'Shea 2002*). La producció de IL-12 inicia un complex feed-back positiu que engloba APCs i cèl.lules T. Amb el reconeixement d'un patògen per part de les APCs s'inicia la secreció i activació de la IL-12. La IL-12 indueix la producció d'IFN γ , que atrau més APCs que també produiran més IL-12. Simultàniament s'inicia la diferenciació de les cèl.lules T (naïve) amb cèl.lules Th1 (*Ma 2001*). De forma interessant, sembla que un efecte de la IL-12 sobre les APCs sigui l'augment d'expressió de IL-23, suggerint una sinèrgia per donar millor resposta al patògen. En combinació amb la IL-27 l'efecte polaritzador de la IL-12 cap a la resposta Th1 es veu incrementada (*Belladonna 2002*).

La IL-12 també promou la secreció d'IFN γ i l'activitat citolítica de les natural killer (NK), procés que es veu augmentat amb l'ajuda de IL-2 (*Nakahira 2002*). L' IFN γ actuarà com a regulador positiu mentre que l'activitat de la IL-12 es veu antagonitzada per IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 i els IFNs tipus 1 (*Takenaka 1997*).

L'ús de diversos models animals ha aportat llum a la importància de la IL-12 en el sistema immune. L'indispensable rol de la IL-12 en el desenvolupament i manteniment de la resposta Th1 és evident en diversos models infecciosos on la resposta Th1 és fonamental. En aquest sentit la neutralització d'un bacteri intracel·lular a través de la producció d'IFN γ , la lisi directa per part de les NK i la resposta dels macròfags depèn en la seva totalitat de la IL-12 (*Gazzinelli 1993*).

Més evidències de la importància de la IL-12 en la resposta Th1 provenen de l'observació de com l'anticòs monoclonal anti-IL-12 p40 redueix significativament l'encefalitis autoimmune experimental (EAE) (*Constantinescu 1998*). Inicialment es va concloure que era el bloqueig de la IL-12 la que podia prevenir o revertir la malaltia, però posteriorment amb el descobriment de la IL-23 es va observar que en aquest cas el bloqueig de la p40 amb l'anticòs, bloquejava realment l'efecte de la IL-23 i la seva inducció de les cèl·lules Th17, responsables de la progressió de la EAE. Com a suport d'aquestes observacions trobem que els macròfags de ratolins genèticament susceptibles a la EAE (ratolins SJL) i diabetis tipus 1 (ratolins NOD, diabètic no obesos), expressen de forma aberrant alts nivells de IL-12p40, mentre que la seva expressió d' IL-12p35 és la mateixa que la dels ratolins de la mateixa soca que no presenten la malaltia (*Collison 2008*).

b) Factor anti-angiogènic i anti-tumoral

Fins ara només hem parlat del paper d'aquestes interleucines en la inflamació, on sembla tenen les seves funcions més destacades, però és cert que entre la inflamació crònica i la inflamació associada als tumors hi ha moltes similituds, com ara la infiltració per cèl·lules del sistema

immune, elevació de l'activitat de les metaloproteases i l'augment de l'angiogènesi (*Coussens 2002*). Brunda et al van demostrar com la IL-12 in vivo tenia un important efecte anti-tumoral en ratolins (*Brunda 1993*). A partir d'aquestes observacions, l'any 1995 Folkman et al. van descobrir que els potents efectes antiangiogènics de la IL-12 són dependents de la seva inducció d'IFN γ (*Voest 1995*). Així doncs, la IL-12 a nivell tumoral d'una banda activa les cèl.lules de la immunitat innata NK i també la resposta adaptativa. La secreció d'IFN γ per part d'aquestes cèl.lules disminueix la neovascularització i altera la matriu extracel.lular inhibint les metaloproteases i per tan la invasió tumoral. Tot i que s'han realitzat diversos intents per aprofitar les característiques anti-tumorals de la IL-12 de forma terapèutica, de moment els resultants no han estat especialment exitosos (*Del Vichio 2007*).

Interleucina 23

La interleucina 23 (IL-23) formada com hem esmentat anteriorment per les subunitats p40 que comparteix amb la IL-12 i la p19, va ser descoberta l'any 2000. Oppmann et al. Van identificar la subunitat p19 rebent aquest nom pel seu pes molecular aproximat (18.7 kDa). La p19 conté cinc residus de cisteïna i cap lloc per N-glicosilació tot i que té predits varis llocs per O-glicosilació (*Hansen 1998*). La p19 humana i la de ratolí comparteixen el 70% de la seva seqüència i la seva estructura és molt similar a la p35 que com hem dit està fortament relacionada amb la IL-6 (*Oppmann 2000*).

Expressió i secreció

Aparentment la p19 s'uneix amb la p40 formant un enllaç covalent i només es pot secretar unida a aquesta subunitat. Quan es va mirar la possible activitat biològica de la p19 (p19 del ratolí) en diversos assaigs in vitro, Oppmann et al. la van considerar inactiva en absència de la p40.

És expressada bàsicament per les mateixes cèl.lules que expressen IL-12: macròfags, cèl.lules T i DCs. També se sap que el mRNA de la p19 és expressat per les cèl.lules endotelials després de l'estimulació de TNF α (Oppmann 2000).

Receptor i senyalització intracel.lular

El receptor de la IL-23 està compost per dues cadenes: IL-12R β 1 i IL-23R (Parham 2002).

De la mateixa manera que en la senyalització de la IL-12, IL-12R β 1 és la cadena que es requereix per unir fortament la interleucina mentre que la IL23R és el component de transducció de la senyal a través de tres residus intracel.lulars de tirosina.

Mentre IL-12R β 1 és expressat en múltiples tipus cel.lulars, IL23R es troba pobrement expressat en: cèl.lules T, NK, monòcits i DCs (Parham 2002), cèl.lules que primàriament responen a IL-12. IL23R el trobem altament expressat en les cèl.lules T de memòria (CD4+CD45RBlo) però no s'expressa en les cèl.lules T naive (CD4+CD45RBhi). A més de les cèl.lules T de memòria el trobem altament present en les cèl.lules Th17, fet que és consistent amb el rol de la IL-23 de mantenir la homeostasi de les cèl.lules Th17.

De forma similar a la IL-12, la IL-23 també activa Tyk 2, Jak 2 i STAT 1, 3 i 4. Tot i que la fosforilació de STAT 4 no és predominant com amb la IL-12 i sembla més aviat STAT 3 el principal mediador de la senyalització promoguda per IL-23 (*Trinchieri et al Immunity 2003*).

Funció

a) Inflamatòria

La IL-23, també és una citocina pro-inflamatòria que com la IL-12 indueix la producció d'IFN γ i promou la resposta Th1. La IL-23 participa en el feed-back positiu promovent la producció de la IL-12 que al mateix temps augmenta l'expressió de IL-23 per part de les DCs. De tota manera, en absència de IL-23 la producció de IFN γ i la diferenciació a Th1 es mantenen, indicant que IL-12 i IL-23 actuen sinèrgicament però que la presència de IL-23 no és essencial per la diferenciació a Th1. També s'ha de tenir en compte que el tipus cel.lular que més respon a la IL-23 no és la cèl.lula T naïve (CD4+CD45RB^{hi}), que prolifera sobretot en resposta a la IL-12, sino les T de memòria (CD4+CD45RB^{lo}) (*Belladonna 2002*). A més la IL-23 promou l'activitat de les cèl.lules NK i fa sinèrgia amb la IL-12, IL-18 i IL-2 en la producció d'IFN γ per part d'aquestes cèl.lules.

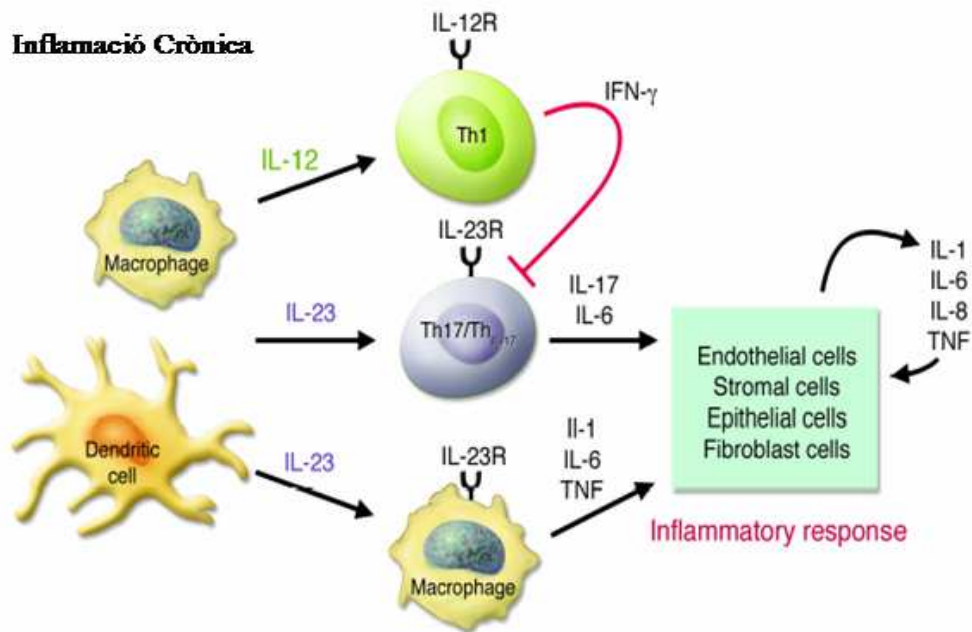
Estudis comparatius de models experimentals han demostrat com els ratolins deficients per IL12-p40 i IL-23p19 no desenvolupen models de malaltia autoimmune com la EAE. Mentre que el dèficit de IL-12p35 els fa igual de susceptibles a la malaltia. De manera que com apuntàvem anteriorment sembla que és el dèficit funcional de IL-23 i no el de IL-12 el que dóna resistència a

la EAE (*Cua 2003*). Recolzant aquest fet es va veure com el tractament amb anti-IL23 bloquejava la invasió del SNC per part de cèl.lules T i macròfags prevenint el rebrot de la EAE, almenys parcialment (*Chen 2006*).

A diferència de la IL-12 s'ha vist que l'estimulació de les cèl.lules T en presència de IL-23 porta a la producció per part d'aquestes cèl.lules de IL-17 (*Aggarwal 2003*). Citocina clarament relacionada en el desenvolupament i manteniment de la inflamació crònica. La IL-17 caracteritza un subgrup de cèl.lules T, Th17, amb un fenotip diferent als prèviament descrits Th1 o Th2. De fet, sembla que la IL-23 és necessària per la completa diferenciació i funció de les cèl.lules Th17 (*Betelli 2005*).

S'ha vist que la IL-23 és especialment expressada per les APCs a nivell intestinal i que aquesta elevació de IL-23 per una colònia de DCs es troba en ratolins amb colitis com a model de malaltia inflamatòria intestinal però no en els seus controls (*Krajina 2003*). També la IL-23 es troba altament expressada en les lesions psoriàtiques, on bàsicament es detecta p40 i p19 en absència de p35 (*Lee 2004*). Tot plegat sembla indicar que la IL-23 té un rol important en les patologies dirigides per la resposta Th17.

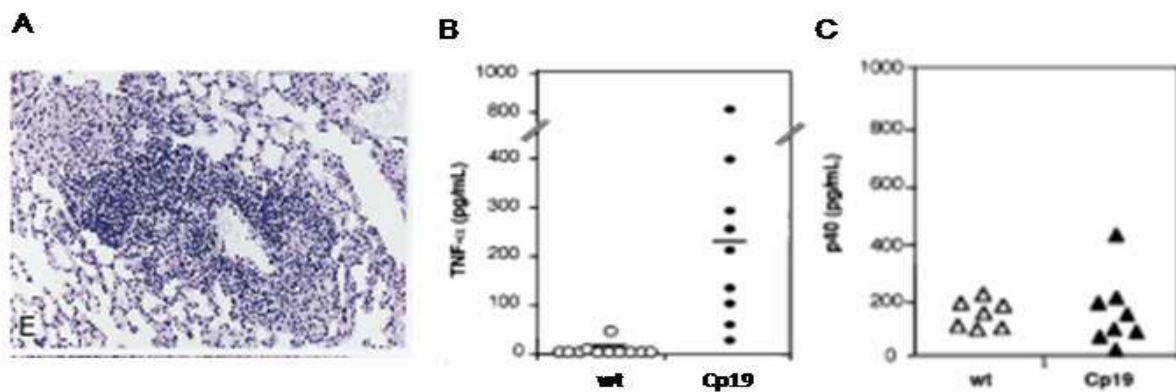
Figura 5. Esquema del mecanisme de la inflamació crònica adaptat de Iwakura Y. *The Journal Clinical Investigation* 2006.



Pel que fa a models animals, a més dels “knock out” en models experimentals com la EAE esmentat anteriorment, destaquen altres exemples que ens ajuden a definir les funcions d’aquesta citocina. L’any 2001 Wiekowski et al. van crear un ratolí transgènic amb expressió ubíqua per IL-23p19 que fenotípicament va presentar inflamació multiorgànica, anèmia, poc creixement i mort prematura. Destacaven a més en la histologia d’alguns òrgans com el pulmó, la presència d’infiltrats inflamatoris vasculars compostos bàsicament per limfòcits i cèl·lules mononuclears (figura 6 A). A nivell sèric van trobar augment d’algunes citocines inflamatòries com ara TNF α però de forma curiosa no van trobar diferències entre controls i ratolins transgènics pel que fa a

nivells de p40 (figura 6 B i C). Quan van intentar reproduir aquestes anormalitats només amb l'expressió específica de p19 a nivell hepàtic els resultats no es van reproduir. El que si va reproduir el fenotip va ser la transferència al moll d'ós de la p19, fet que els va fer pensar en les cèl.lules hematopoietiques com a font de p19 biològicament activa. En tot cas aquest estudi obre alguns interrogants pel que fa a la funció de la p19 i la seva activitat només lligada a la p40. (Wiekowski 2001)

Figura 6. A. Inflamació perivascular. B. Nivells en sèrum de TNF α . C. Nivells en sèrum de p40. B i C. Diferències entre controls i ratolins transgènics per p19. Adaptació de Wiekowski MT, *J Immunol* 2001, 166:7563-7570



b) Factor angiogènec

Mentre la IL-12 promou la infiltració en el tumor per cèl.lules T citotòxiques i té un efecte anti-angiogènec a través de la inducció de l'IFN γ , la IL-23 promou la resposta inflamatòria a nivell tumoral augmentant MMP9 i l'angiogènesi, però reduint la infiltració per les cèl.lules T-CD8. La IL-23 s'ha vist augmentada en diferents tumors humans i sembla que el seu dèficit o el seu bloqueig en ratolins disminueix el tamany dels tumors (*Langowski 2006*). Aparentment el seu efecte pro-angiogènec podria ser pel fet que promou la MMP9 i la IL-17, ambdues, molècules que s'han mostrat promotores de la neovascularització (*Numasaki 2003*).

Resposta Th17 i interleucina 17

L'any 1986 Coffman i Mosmann postulaven l'existència de dos subtipus de cèl.lules Th amb diferent secreció de citocines, Th1 i Th2 (*Mosmann 1989*). Aquesta idea s'ha mantingut gairebé durant 20 anys fins que alguns estudis van començar a posar de manifest que la IL-23 estimulava la producció de IL-17A en un subtipus de cel.lules CD4 (*Aggarwal 2002*). Aquest fet, sumat als estudis que van demostrar que és la IL-23 més que la IL-12 la que pot tenir un paper fonamental en algunes inflamacions cròniques d'origen autoimmune i que no era a través de la resposta Th1 (*Cua 2003*) fan que a dia d'avui es parli d'una nova branca en la família de les cèl.lules Th coneguda com Th17.

L'estimulació de les cèl.lules T en presència de la IL-23 dóna lloc a la producció d'IL-17 clarament relacionada amb el desenvolupament i manteniment de la inflamació crònica. IL-17A és un homodímer unit per un pont disulfur amb un pes molecular calculat de 17.5 kDa.

La resposta Th17 amb poc temps s'ha col·locat com a medidora indispensable de moltes patologies inflamatòries i autoimmunes i ha demostrat un rol actiu en el càncer.

Diferenciació de les cèl.lules Th17

Es considera que les Th17 són un tipus de CD4 diferenciades no només per les interleucines que secreten sino també perquè els seus factors de diferenciació i transcripció són únics.

El 2006 tres estudis independents van concloure que el TGF- β i la IL-6 eren indispensables perquè cèl.lules T naïve produïssin IL-17 (*Veldhoen 2006, Bettelli 2006, Mangan 2006*). El fet que el TGF- β participi en aquesta diferenciació relaciona estretament les Th17 amb les T reguladores (Treg), que tenen el Foxp3+ com a factor de transcripció, ja que el TGF- β també és inductor de la diferenciació d'aquestes cèl.lules. Bàsicament s'ha observat que les cèl.lules T naïve, en presència del TGF- β , expressen Foxp3+ i esdevenen T reg. Però la presència del TGF- β , sumada a la IL-6 o la IL-21 fan que la cèl.lula T esdevingui Th17.

A nivell funcional el requeriment del TGF- β per la inducció d'ambdues: Foxp3+ Tregs i cèl.lules Th17, pot ser un sistema de balanç entre tolerància i immunitat. En condicions estables, el TGF- β induïx Foxp3 i cèl.lules Tregs, inhibint la inflamació i mantenint la tolerància. L'aparició de la IL-6 produïda pel sistema immune innat en resposta al algun antigen modificaria

aquesta diferenciació suprimint les Tregs i induint les Th17, capaces de produir resposta inflamatòria. A nivell molecular, el balanç entre els dos tipus cel·lulars vindria donat per la interacció antagonista entre els dos factors de transcripció Foxp3 i ROR γ t (*Korn 2009*).

La IL-21 és produïda per les mateixes Th17 i s'ha demostrat que conjuntament amb el TGF- β és capaç d'induir la diferenciació de les Th17. Produint-se d'aquesta manera un feed-back positiu com a factor amplificador (*Nurieva 2007*).

Durant molt de temps, el rol de la IL-23 en la diferenciació de les Th17 ha estat difícil d'establir. Les cèl·lules T naïve no expressen IL23R, però en canvi s'ha demostrat essencial per establir aquesta diferenciació i per exemple induir la secreció d' IL-22 (*McGeachy 2007*).

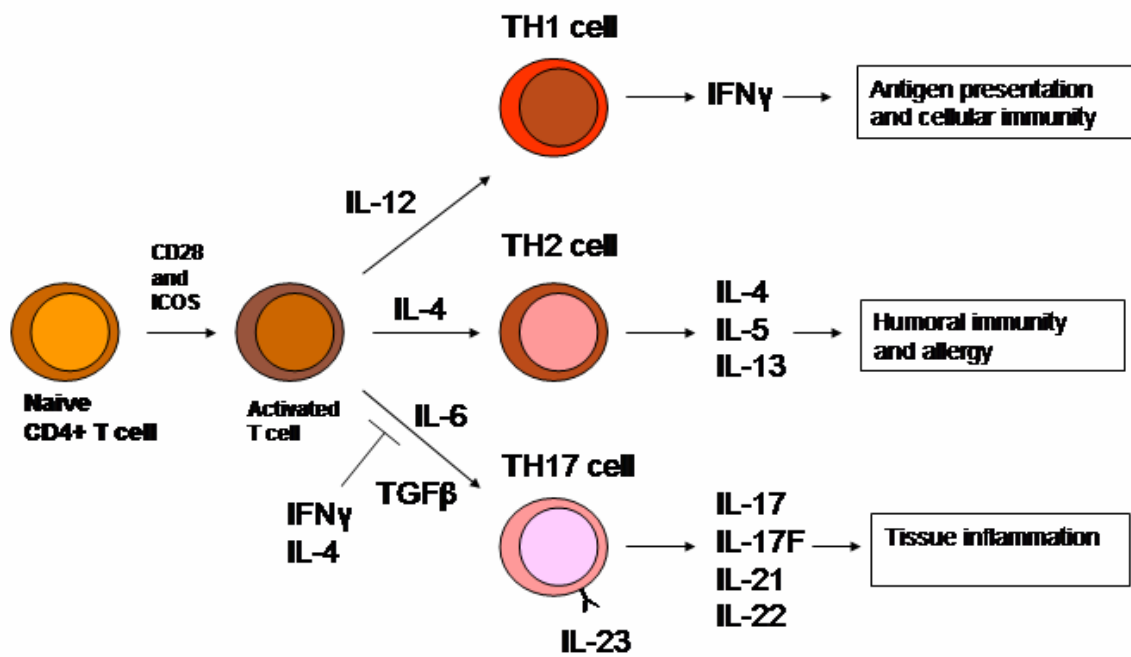
En resum, pel que fa a la diferenciació d'aquestes cèl·lules, podriem dir que es completa amb tres passos:

- 1) El TGF- β i la IL-6 indueixen la diferenciació.
- 2) La IL-21 l'amplifica
- 3) La IL-23 finalitza el procés de diferenciació i estabilitza el fenotip Th17.

Pel que fa als factors de transcripció s'han descrit: STAT3, IRF4, ROR γ t i ROR α . ROR γ t aparentment és indispensable per la producció de IL-17 (*Ivanov 2006*) i recentment s'ha descrit ROR α , molt similar a l'anterior i que només s'expressa per les cèl·lules Th17 (*Yang 2009*). El mecanisme pel qual aquests dos factors de transcripció regulen la producció de IL-17 no queda clar.

Figura 7. Diferenciació de les cèl.lules CD4+. Adaptació de l'article: Betelli. Nature Immunology 2008.

T-helper-cell differentiation



Interleucina 17

La IL-17 (IL-17A) és el membre fundador de la família de citocines IL-17 que inclou: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (també anomenada IL-25) i IL-17F (Aggarwal 2002). La IL-17 anomenada originàriament CTLA-8 va ser clonada el 1993 en cDNA de ratolí (Rouvier 1993) i posteriorment la IL-17 humana i el seu receptor van ser descoberts (Yao 1995, Shi 2000).

La IL-17A i la IL-17 F són les que presenten major homologia podent formar homodimers i també heterodimers (IL17A/IL17F) i semblen les més implicades en inflamació i autoimmunitat induint l'expressió de citocines (TNF, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, G-CSF), quimiocines (CXCL1, CXCL8, CXCL10) i metaloproteinases (Park 2005). Poden ser produïdes a més de per cèl·lules Th17 per altres cel·lules T, cèl·lules NKT, NK, neutròfils i eosinòfils (O'Brien 2009). La IL-25 induïx l'expressió de citocines i quimiocines pròpies de la resposta Th2. Les funcions de la IL-17B, IL-17C i IL-17D estan poc definides.

Receptor IL-17

Els IL-17R són 5 subunitats (IL17RA- IL-17RE) i constitueixen una família de receptors de citocines diferents (Moseley 2003). Totes les subunitats són un domini transmembrana amb una llarga prolongació citoplasmàtica. El IL-17RA i el IL-17RC són els receptors per les IL-17A i IL-17F (Kuestner 2007). El IL-17RA és altament expressat en les cèl·lules hematopoïètiques però també en nivells baixos de forma gairebé ubiqüa. Malgrat IL-17 sembla activar les vies MAPK i NF- κ B (Shalom-Barak 1998) la cascada de senyalització del IL-17R és encara desconeguda.

Citocines a estudi i el seu rol en algunes malalties inflamatòries/autoimmunes

1) Artritis Reumatoide

Utilitzant el model animal d'artritis induïda per col·làgen (CIA) es va comprovar que els ratolins amb dèficit de IL-12 (p35^{-/-}) presentaven un empitjorament de la patologia, mentre que els "knock-out" per p19 es feien resistents a la mateixa, correlacionant-se amb una absència de cèl·lules T CD4⁺ productores de IL-17. També es va veure com aquestes cèl·lules Th17 augmentaven en els ratolins amb dèficit d' IL-12p35, pel que es va concloure tal i com també s'havia vist per l'EAE, que és la IL-23, la citocina que té un rol pro-inflamatori, mentre que la IL-12 paradoxalment semblava un factor protector de la inflamació autoimmune (*Murphy 2003*).

En els darrers anys han aparegut diverses evidències de que és la IL-23 més que no pas la IL-12 la que té un paper crucial en la patogènia de desordres autoimmunes. També s'ha comprovat l'augment d'expressió d'aquesta citocina tan per part dels fibroblasts de la membrana sinovial com a nivell plasmàtic en els pacients amb artritis reumatoide. A més a més s'ha vist com un determinat polimorfisme en el receptor de la IL23 (IL23R rs11209026) es correlaciona amb un augment significatiu dels nivells de IL-17 (*Hazlett 2011*). Tot això ha portat a pensar en la IL23 i el seu receptor IL23R com a possibles dianes terapèutiques en aquesta patologia.

Recentment es va realitzar un estudi fase II, randomitzat, doble cec amb 29 pacients que va evaluar l'efecte de l'apilimod mesilat via oral com a inhibidor de la producció d' IL-12 i IL-23 en pacients amb artritis reumatoide. Tot i que es desconeix amb exactitud el mecanisme d'acció del fàrmac se sap que suprimeix la IL-12 i la IL-23 a nivell transcripcional, reduint l'activitat de p35 i p40 mitjançant una inhibició selectiva de la transcripció d'un membre de la família dels

factors de transcripció de la NF- κ B (c-Rel) (*Wada 2007*). Els resultats de l'estudi no han demostrat que la inhibició d'aquestes interleucines provoqui una milloria significativa en l'artritis reumatoide (*Krausz 2011*).

Pel que fa a la IL-17, la disminució d'aquesta interleucina en els models animals ha evidenciat una milloria en la CIA. També hi ha algunes evidències de que els nivells d'aquesta interleucina en sèrum i en el líquid sinovial de pacients amb artritis reumatoide es correlacionen amb la gravetat d'aquesta malaltia (*Metawi 2011*). I s'ha demostrat que la resposta Th17, no només és important en l'artritis reumatoide sino també en altres espondiloartritis com l'artritis psoriàsica. Recentment en ambdues patologies s'ha descrit com mastòcits i neutròfils són les cèl.lules productores més importants de IL-17 i com en algunes espondiloartritis el tractament amb anti-TNF α disminueix la producció d'IL-17 dels neutròfils sense afectar la dels mastòcits (*Noordenbos 2012, Hueber 2010*).

2) Malaltia de Crohn

Es creu que la malaltia de Crohn és resultat d'una complexa interacció de diferents fenòmens: genètics, ambientals i alteració de la resposta immune. La hipòtesi actual és que es produeix una resposta immune mediada per cèl.lules T excessiva davant la flora comensal bacteriana en pacients genèticament predisposats i precipitat per algun factor ambiental. És una malaltia crònica amb inflamació de la mucosa intestinal. Després de l'estimulació de les cèl.lules presentadores d'antigen a aquest nivell, es desencadena una resposta immunològica amb participació de les cèl.lules T CD4+, Th1, Th2, Th17 i Treg. La malaltia de Crohn per tan, està

altament associada a les respostes Th1 i Th17 i a les citocines que estem estudiant (*Peluso 2006, Neurath 2007*).

Diversos estudis han demostrat l'augment de la IL-12 i la IL-23 en aquesta malaltia i també com la seva secreció i la de les interleucines IL-17 i IL-6 disminueix després del tractament amb l'anticòs anti-p40 (*Fuss 2006*).

Malgrat hi ha evidències preliminars de que els anticòsos com ustekinumab que actuen disminuint l'acció d'IL-12 i IL-23 poden induir remissió clínica i remissió de la malaltia (*Sandborn 2008, Mannon 2004*), recentment també es va fer un estudi amb apilimod-mesilat, aquest inhibidor de la secreció de les subunitats p40 i p35 que hem vist en l'artritis reumatoide sense demostrar benefici en els pacients estudiats. Una possible explicació és que la inhibició per part d'aquest fàrmac sigui només parcial i altres vies de producció es mantenen inalterades (*Bruce 2010*).

3) Psoriasi

La IL-23 i la resposta Th17 estan altament implicades en la patogènesi de la psoriasi d'altres malalties cutànies. La inhibició d'aquesta via amb Ustekinumab (anti-p40) està aprovat com a tractament biològic de la psoriasi moderada-severa. I de moment amb relativa bona tolerància malgrat es requereixen més estudis per determinar eficàcia i seguretat a més llarg termini.

Altres anticòsos estan essent desenvolupats en l'actualitat com briakinumab (ABT-874) o secukinumab (AIN-457) que interfereix l'activitat de la IL-23 (*Kurzeja 2011*).

HIPÒTESI

1) Malgrat la resposta inicial dels malalts amb ACG al tractament amb corticoides, la malaltia persisteix activa en la major part de pacients i recidiva en reduir el tractament. Investigar els factors que contribueixen a la perpetuació de la inflamació vascular, és un dels interrogants més rellevants en aquesta malaltia. Fins ara sabem que la resposta inflamatòria en l'ACG està bàsicament mitjançada per les cèl·lules Th1 i que són molts els factors implicats en aquesta diferenciació.

En diferents models experimentals la producció de IL-12 i IL-23 estimulen la secreció d'IFN γ i IL-17 per part de les cèl·lules Th1 i Th17 provocant el desenvolupament i manteniment de la inflamació. Partint de la troballa observacional (generada a partir de l'estudi de les segones biòpsies en l'assaig multicèntric amb infliximab) de que canvis en la producció de la IL-12p40 es correlacionen amb l'evolució de la malaltia independentment del tractament i dels treballs amb models experimentals exposats anteriorment, ens hem proposat estudiar com IL-12, IL-23 i IL-17 s'expressen en el teixit i en el sèrum de pacients amb ACG intentant establir una correlació amb l'evolució i la resposta al tractament.

2) Per altra banda sabem que l'estudi dels patrons histològics de l'ACG, l'estudi immunofenotípic dels leucòcits infiltrants i l'expressió de molècules d'adhesió endotelial, suggereixen els petits vasos que envolten d'adventícia arterial, com a punt d'entrada de les cèl·lules inflamatòries. A aquest nivell es produeixen interaccions complexes entre l'endoteli d'aquests vasos i els leucòcits. Sabem que IL12 i IL23 són produïdes per cèl·lules inflamatòries

en resposta a l'estimulació de Toll like receptors (TLRs), però se sap ben poc del seu rol a nivell de l'endoteli. IL23p19 mRNA s'expressa en cèl·lules endotelials estimulades amb TNF α , però es desconeix si la IL23 pot ser produïda en altres condicions inflamatòries i quina pot ser la seva activitat biològica en aquestes cèl·lules endotelials. Una de les funcions fonamentals de l'endoteli es l'angiogènesi o neovascularització. Fenòmen present en l'ACG i un mecanisme important per perpetuar la inflamació crònica i el creixement tumoral. IL-12 té activitat anti-angiogènica mentre que a la literatura hi ha algunes evidències que suggereixen un efecte pro-angiogènica de la IL-23, però el mecanisme queda poc clar. Ens proposem investigar el paper de la IL23 en les cèl·lules endotelials i si aquesta pot participar en els passos inicials i en la persistència de la inflamació en l'ACG.

OBJECTIUS

1. Investigar l'expressió de p40/p35 (IL-12) i p19/p40 (IL-23) i IL-17 en artèries temporals de pacients amb arteritis de cèl·lules gegants, tractats i seguits prospectivament mitjançant tècniques de RT-PCR quantitativa a temps real i immunohistoquímica.
2. Determinar les concentracions de p40, p35, p19 i IL-17 en sèrum de pacients amb ACG obtinguts abans d'iniciar el tractament mitjançant tècniques d'ELISA.
3. Estudiar la possible correlació entre l'expressió arterial i concentracions sèriques d'aquestes citocines, la intensitat de la resposta inflamatòria sistèmica en el moment del diagnòstic i la resposta al tractament en una sèrie àmplia de pacients tractats i seguits prospectivament.
4. Investigar mitjançant RT-PCR quantitativa, ELISA i western-blot, la producció de les citocines IL12-IL23 en cèl·lules endotelials estimulades amb lligants dels TLRs com LPS entre d'altres.
5. Induir sobreexpressió de IL23p19 en les cèl·lules endotelials i estudi dels seus efectes en la funció inflamatòria de les mateixes, estudiant canvis en el mRNA de gens inflamatoris d'aquestes cèl·lules mitjançant PCR quantitativa.

6. Estudiar l'efecte de la sobreexpressió de IL23p19 en les cèl.lules endotelials i els seus efectes en respostes relacionades amb l'angiogènesi com a mecanisme de persistència de la inflamació, mitjançant estudis in vitro de migració i diferenciació.

7. Determinar l'efecte in vivo de la IL23p19 en les cèl.lules endotelials mitjançant l'implant de plaques de matrigel amb injecció de cèl.lules endotelials amb sobreexpressió de p19 i estudiar diferències en angiogènesi mitjançant immunotinció.

MATERIAL I MÈTODES

Pacients

Entre l'any 1997 i el 2006, 158 pacients en la nostra institució (Hospital Clínic) van ser diagnosticats amb biòpsia temporal d'ACG. Les dades clíniques van ser recollides en el moment del diagnòstic i introduïdes en una base de dades. Es va poder extreure RNA total de 57 d'aquestes biòpsies abans de l'inici del tractament (38 pacients) i després d'almenys 2 dosis de prednisona (19 pacients). Es va poder obtenir plasma-citrat de 33 pacients abans de l'inici del tractament. De 7 pacients a més a més es va fer extracció de proteïna. Les dades clíniques d'aquest grup d'estudi eren similars a altres sèries publicades prèviament (Taula 1). Es va considerar que els pacients presentaven una *resposta inflamatòria sistèmica dèbil* quan tenien entre 0-2 de les següents característiques: febre $> 37^{\circ}\text{C}$, pèrdua de pes $> 3\text{Kg}$, Hb $< 110\text{ g/L}$, VSG $\geq 85\text{mm}$. Quan presentaven entre 3-4 d'aquestes troballes clíniques i/o analítiques es va considerar com a *resposta inflamatòria sistèmica intensa*. Aquesta distinció en aquests dos grups en altres publicacions s'ha demostrat útil per definir subgrups de pacients que presenten diferent evolució clínica.

Tots els pacients van ser tractats pel nostre grup amb criteris uniformes. La dosi inicial de prednisona va ser 1mg/Kg al dia (màxim 60 mg/dia) durant 1 mes amb reducció progressiva entre 5-10 mg/ setmana. Les reduccions per sota dels 15mg/dia van ser més lentes i individualitzades en funció de l'evolució del pacient. Quan la VSG es troba per sobre de 50 mm/h i apareixen símptomes clínics o quan molt clarament hi ha un empitjorament o nova

aparició de símptomes amb una VSG normal o només lleugerament elevada s'ha considerat com un rebrot. Al final de l'estudi tots els pacients tenien una reducció de la prednisona per sota 10 mg/dia (200 setmanes). Es va fer recollida del temps requerit en setmanes per assolir una dosi de manteniment de menys de 10 mg/dia i el temps per assolir completament la retirada del tractament sense presentar noves recaigudes.

Com a controls pel plasma es van obtenir 7 voluntaris amb edat (mitja 76, rang 65-90) i distribució del sexe (5 dones i 2 homes) semblant al de la malaltia. Els controls no tenien història de càncer, malaltia inflamatòria crònica o infecció recent. Com a biòpsies de control es van incloure 19 pacients (13 dones i 6 homes) amb una mitja d'edat de 77 anys (rang 64-91) en els quals inicialment s'havia sospitat una possible ACG i que posteriorment van ser diagnosticats d'una altra malaltia.

L' estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica del nostre hospital i els pacients van signar el consentiment informat per la recollida i emmagatzemament. del material biològic.

Cèl.lules

S'han utilitzat cèl.lules endotelials de cordó umbilical (HUVEC) cultivades en M199 medi complert tal com es descriu (*Narazaki 2006*). La línia cel.lular híbrida HUVEC-epitelial A594 (EAHY926) de l' American Type Culture Collection (Manassas, VA) i la línia humana de ronyó 293T (regal del Dr. H. Mitsuya, HIV and AIDS Malignancy Branch, NCI) van ser cultivades en DMEM Glutamax (Invitrogen, Carlsbad, CA) amb 10% de sèrum boví fetal (FBS, Atlanta Biologicals, Lawrenceville, GA).

Extracció de RNA i síntesi de cDNA

Les artèries temporals es van preservar (OCT, Sakura, Netherlands), congelades instantàniament en nitrogen líquid i emmagatzemades a -80C fins a la seva utilització. Seccions consecutives a les que van donar el diagnòstic histopatològic van ser processades per l'aïllament de RNA. Per l'extracció de RNA tan a nivell de l'artèria com de les cèl.lules HUVEC i EAHY es va utilitzar TRIzol® Reagent (Invitrogen, Calsbad, CA).

El cDNA es va sintetitzar amb transcripció reversa del total de RNA ($1 \geq \mu\text{g}$) utilitzant Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) per les artèries en un volum final de 100 μL i per les cèl.lules es va utilitzar High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

PCR-RT quantitativa

IL-12p40, IL-12p35, IL-23A i IL-17A, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCR3, CXCR4, CXCR7, CCL2, CDH5, SDF-1, VEGF, VEGFR2, FGF2, FGFR1, Jag2, Hey1, Hey2, DLL4, MMP1, MMP14, TIMP1, IL-6, IL-17, IL-17R, PECAM-1 i TGF β -1 mRNA van ser mesurats per real-time PCR a partir de l'amplificació del cDNA corresponent a 1 μg de RNA amb la Taqman PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems) i Taqman gene expression probes (Applied Biosystems). La quantitat de RNA s'expressa en unitats relatives.

Immunohistoquímica

De les artèries temporals es van obtenir seccions seriades amb el criostat de 4-6 µm. Les seccions es van fixar amb acetona i permeabilitzar amb saponina 0.1%. Es va bloquejar la peroxidasa endògena amb H₂O₂ i les mostres es van incubar amb l'anticòs primari. Les dilucions més òptimes es van testar prèviament amb seccions quirúrgiques d'amígdales humanes (control positiu). Immunoglobulines de la mateixa espècie servien de control negatiu. Es va realitzar la immunodetecció amb un polímer conjugat amb els anticossos secundaris HRP-marcats (EnVision Visualization method, Dako, Glostrup, Denmark) utilitzant diaminobenzidina com a cromògen. Anticossos primaris utilitzats: IL-12p40 (mouse monoclonal, clon I-1A4 AbD Serotec, dilució 1:1000), IL-12p35 (rabbit polyclonal ATLAS, dilució 1:1000), IL-23p19 (rabbit polyclonal Abcam, dilució 1:1500), IL-17 (goat polyclonal R&D Systems).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

IL-12, IL-12p40, IL-23 i IL-17A ELISA es van realitzar amb el kit Quantikine[®] Human IL-12, Quantikine[®] Human IL-12p40 i Quantikine[®] Human IL17 Immunoassay de R&D Systems, Minneapolis, MN. Per la IL23 es va utilitzar el IL23 ELISA kit d'Abcam. Les concentracions de les interleucines van ser determinades utilitzant el Parameter ELISA kit segons el protocol del fabricant.

Western-Blott

Es van preparar els extractes cel.lulars de proteïna amb el tampó de lisi TNE (2mM TRIS pH 7.5, 150 mM Na Cl, 5mM EDTA, 1% Triton) amb cocktail inhibidor de proteasa set III (Calbiochem, Darmstadt, Germany), i 1mM de Na orthovanadat. Es va realitzar precipitació de sobrenedants de cultiu cel.lular mitjançant el mètode TCA/DOC descrit a (Peterson 1983). Les preparacions es van corre en NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) i es va fer transferència a les membranes (Whatman GmbH). Els anticossos per la immunotinció: hIL-23p19 (goat IgG R&D systems), hVCAM-1 (polyclonal sheep R&D systems, hICAM-1 (rabbit polyclonal Cell Signaling). Actina (c11) (Santa Cruz Biotechnology). Secundaris: HRP-conjugat rabbit anti-goat IgG-Fc Calbiochem (La Jolla, CA); HRP-conjugat donkey anti-sheep Santa Cruz i donkey anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech).

La unió dels anticossos secundaris es va visualitzar amb quimioluminiscència augmentada (Amersham).

Infecció Lentiviral

A partir del vector IL23p19 de GeneCopoeia cat: Ex-U11167-Lv105, i del seu control LV-PLVX es va fer amplificació d'ambdós seleccionant el DNA amb ampicilina i posteriorment purificant-lo mitjançant Maxiprep (d'Invitrogen), un procediment estandaritzat segons protocol. La transfecció dels plàsmids es va realitzar amb Lipofectamina en cèl.lules 293T segons protocol. Dos dies després es va recollir i filtrar el sobrenedant (mida del porus del filtre 0.45 mm) afegint-lo a les cèl.lules endotelials (HUVEC i EAHY926) cultivades en plaques de 60mm,

80% confluents juntament amb Polybrene (hexadimethrine bromide [Sigma-Aldrich]) a la concentració de 4 µg/ml. Les cèl.lules es van centrifugar (2.500 rpm, 30°C durant 60 min). 18 hores després el sobrenedant es va canviar per medi (medi HUVEC i DMEM 10% respectivament). La selecció de les cèl.lules infectades es va fer afegint Puromicina (Invivogen) 0.5 µg/ml per les HUVEC i 1 µg/ml per les EAHY926.

Assaig de Matrigel in vitro

La formació de cordons en el Matrigel es va fer segons el mètode descrit prèviament (*Yao 2003*). Breument, el Matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA) es va solidificar en plaques de 48 pous a 37° durant 30 min; 15,000 cèl.lules es van cultivar en el gel. Després de 18 hores d'incubació per les HUVEC i 12 hores les EAHY926 les cèl.lules havien format una xarxa entre elles semblant a una estructura en cordó que es pot veure en el camp brillant del microscopi. El número d'angles que formen es va comptar a una baixa magnificació (10X); es van comptar cinc camps/pou i es va fer un promig de la mitjana dels angles tal com es descriu prèviament.

“Scratch assay”

Cultius confluents de cèl.lules EAHY926 en plaques de 24 pous es van rascar, fent una escletxa central en el cultiu utilitzant un protocol estandaritzat amb la realització de tres rentats posteriors consecutius per extreure les restes cel.lulars. Les plaques es van col·locar al sistema IncuCyte tota la nit d'on es van extreure imatges cada 30 minuts. Les corbes del tancament de l'escletxa

oberta en els cultius es van construir automàticament de les dades obtingudes durant les imatges en moviment. Cada punt de dades representa la mitjana (\pm SD) del tancament de l'esclatxa (número de cèl.lules que l'ocupen) de tres camps per pou en tres pous independents.

Adhesió de Monòcits

Es van aïllar monòcits de sang perifèrica mitjançant (Lymphocyte separation mononuclear cells medium) que posteriorment es van resuspendre en PBS a 10⁷/ml amb el tint vermell fluorescent PHK26 (Sigma-Aldrich) durant 10 min a temperatura ambient. Es va afegir SFB (sèrum fetal boví) per parar la reacció i es van fer rentats amb PBS segons protocol de la casa comercial. Les cèl.lules marcades (30.000 per pou) es van afegir a una monocapa de cèl.lules EAHY926 cultivades en plaques de 48 pous, que al seu torn també havien estat marcades pel mateix sistema amb PHK26 verd fluorescent. Després d'una hora d'incubació es van fer rentats comptant les cèl.lules adherents mitjançant un sistema de medició de fluorescència (TECAN).

Assaig de Matrigel in vivo

L'experiment es va realitzar essencialment com està descrit. (*Angiolillo 1995*) . En 4 ratolins (femelles, NOD/SCID, de 6-7 setmanes) es va injectar de forma subcutània Matrigel (BD Bioscience) amb cèl.lules EAHY926 (2×10^6) en un flanc del ratolí infectades amb el vector p19 i en l'altre flanc amb el control. Al cap de 10 dies es van treure les plaques i es van processar per histologia.

Immunofluorescència

Les cèl.lules HUVEC i les EAHY926 infectades, o bé amb el control, o bé amb el p19-lentivirus es van col·locar en cambres-portes de vidre recubertes de fibronetina (BD Biosciences, San Jose, CA). Després de 24h les cèl.lules es van rentar amb PBS, fixar amb paraformalhid 4%, rentar amb PBS i bloquejar amb (PBS + 5% donkey serum + 0.1% Triton + 1% albúmina bovina sèrica). Es van incubar tota la nit amb el primari: hII23p19 anti-goat (R&D systems) (dil. 1:200). L'endemà es van fer rentats de PBST (PBS + 0.1% Triton) i es van incubar amb el secundari Alexa-donkey anti-goat (488 o 546) (dilució 1:200) + DAPI (4_,6_-diamidino-2-phenylindole) durant 1 hora. Després dels rentats amb PBS es van montar les slides amb Dako fluorescent mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark).

Les artèries temporals i els explants de Matrigel van ser fixats amb paraformalhid i incubats en 15% sucrosa en PBS tota la nit, seguit d'una altra incubació amb sucrosa 30% per un o dos dies a 4°C. Posteriorment submergides en OCT (Sakura Finetek, Tokyo, Japó), i en cas de les artèries congelades en un bany de gel sec i metil-butanol i emmangatzemades a -80°C. Es van fer talls dels teixits congelats i es van col·locar en portes de vidre, tenyits amb hematoxilina-eosina (Histoserv, Inc., Germantown, MD). Per la immunotinció es va seguir el mateix procediment utilitzat per la tinció cel·lular detallada anteriorment. Anticossos primaris: hII23p19 anti-goat (R&D systems) (1:200), hCD31 BD Pharmingen (mouse) (1:100) i mCD31 (rat) BD Pharmingen. Secundaris: Alexa-donkey anti-goat 546 (1:350), Alexa-donkey anti-mouse 488 (1:350). Les mostres es van observar i fotografiar amb els microscopis Olympus IX51 (Olympus Optical, Melville NY) i el confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Thornwood, NJ).

Anàlisi Estadístic

Les diferències entre grups s'han evaluat amb el test T de student o el de Mann-Whitney. Les corbes de supervivència s'han analitzat amb Kaplan-Meier. El valor de P s'ha considerat significatiu per sota de 0.05.

Taula 1. Característiques clíniques dels pacients amb ACG

Característiques Clíniques	Pacients ACG (N)
Nº pacients (n)	57
<u>Característiques generals</u>	
Edat en anys, mitja (rang)	78 (58-91)
Sexe, dona/home	45/12
<u>Síntomes cranials</u>	
cefalea	50
claudicació mandibular	43
hipersensibilitat cuir cabellut	15
dolor facial/edema	12
dolor ocular	5
dolor lingual	6
mal d'orella	7
carotidinia	3
dolor dental	5
Odinofàgia	1
Artèria temporal anormal*	13
	52
<u>Events isquèmics cranials</u>	
pèrdua de visió permanent	14
amaurosis fugax	8
diplòpia transitòria	4
AVC	1
	1
<u>Manifestacions sistèmiques</u>	
febre	30
pèrdua de pes	18
	25
Polimiàlgia Reumàtica	24

*Artèries temporals anormals a l'exploració física (doloroses, inflamades, indurades amb/o disminució o absència de pols)

RESULTATS

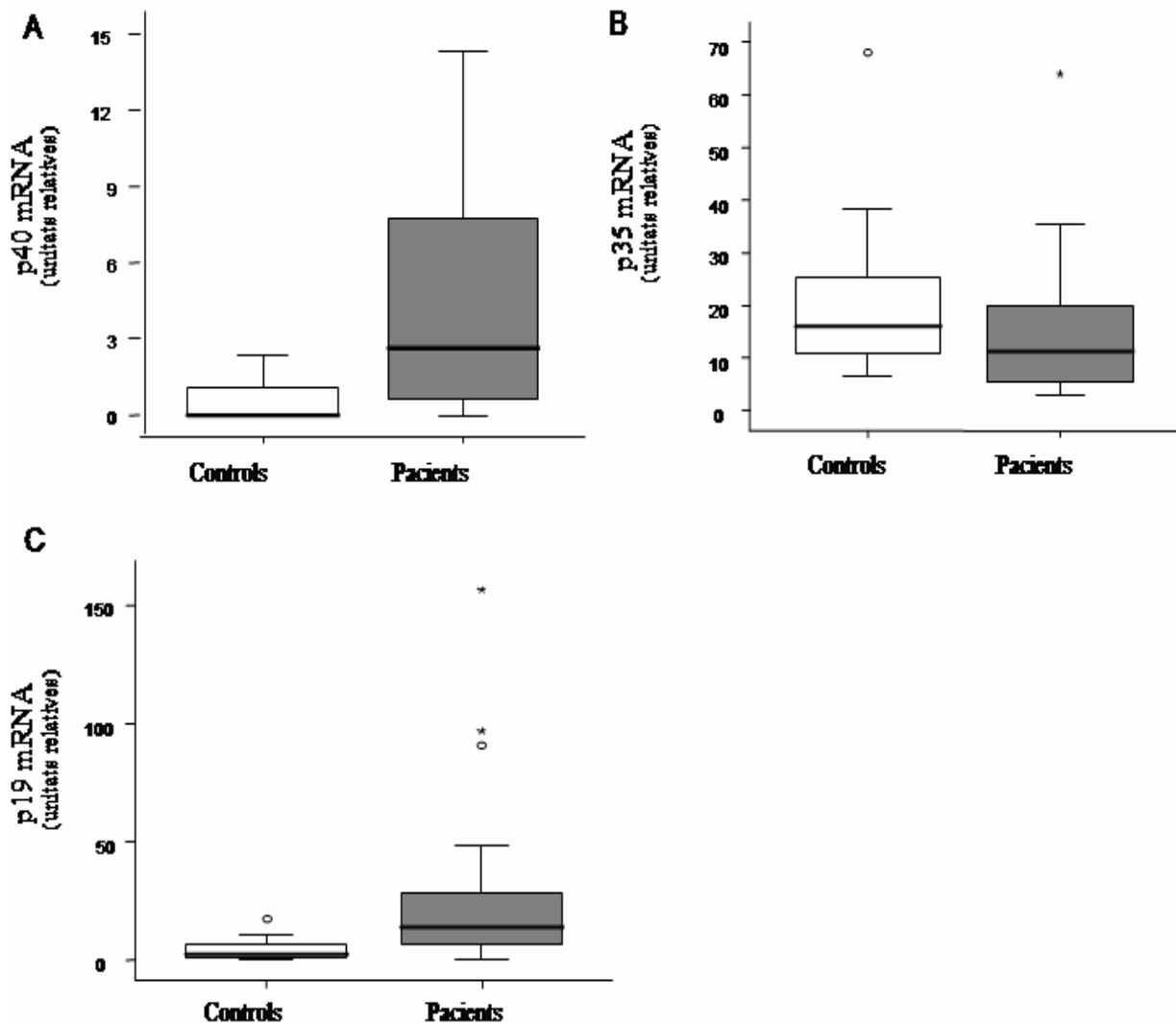
1) Expressió de les interleucines IL-12 p40, IL-12 p35 i IL-23 p19 en l'ACG

1A. Detecció IL-12 p40, IL-12 p35 i IL-23 p19 mRNA en les biòpsies d'artèria temporal

La comparació entre pacients i controls va posar de manifest una clara diferència pel que fa a la presència de p40, essent pràcticament indetectable en els controls i elevant-se en els pacients com mostra el gràfic de la figura 1 (1.68 ± 0.31 unitats relatives vs 0.06 ± 0.06 , $p = 0.0004$). Pel que fa a l'expressió de p35 no vam trobar diferències significatives entre els dos grups (17.75 ± 2.5 vs 25.6 ± 4.8 , $p = 0.11$). En l'estudi de la IL-23p19, observem que també i de forma significativa es troba més elevada en els pacients que en els controls (29.88 ± 6.1 vs 5.55 ± 1.5 , $p < 0.0001$).

Amb aquests resultats es confirmaven doncs, en una sèrie àmplia de pacients la dissociació entre l'expressió de la subunitat p40 i la p35 de la IL-12 i l'augment de la p19 en les lesió inflamatòries de l'ACG. Sugerint un possible rol especialment de la IL-23, en la patogènia de l'ACG.

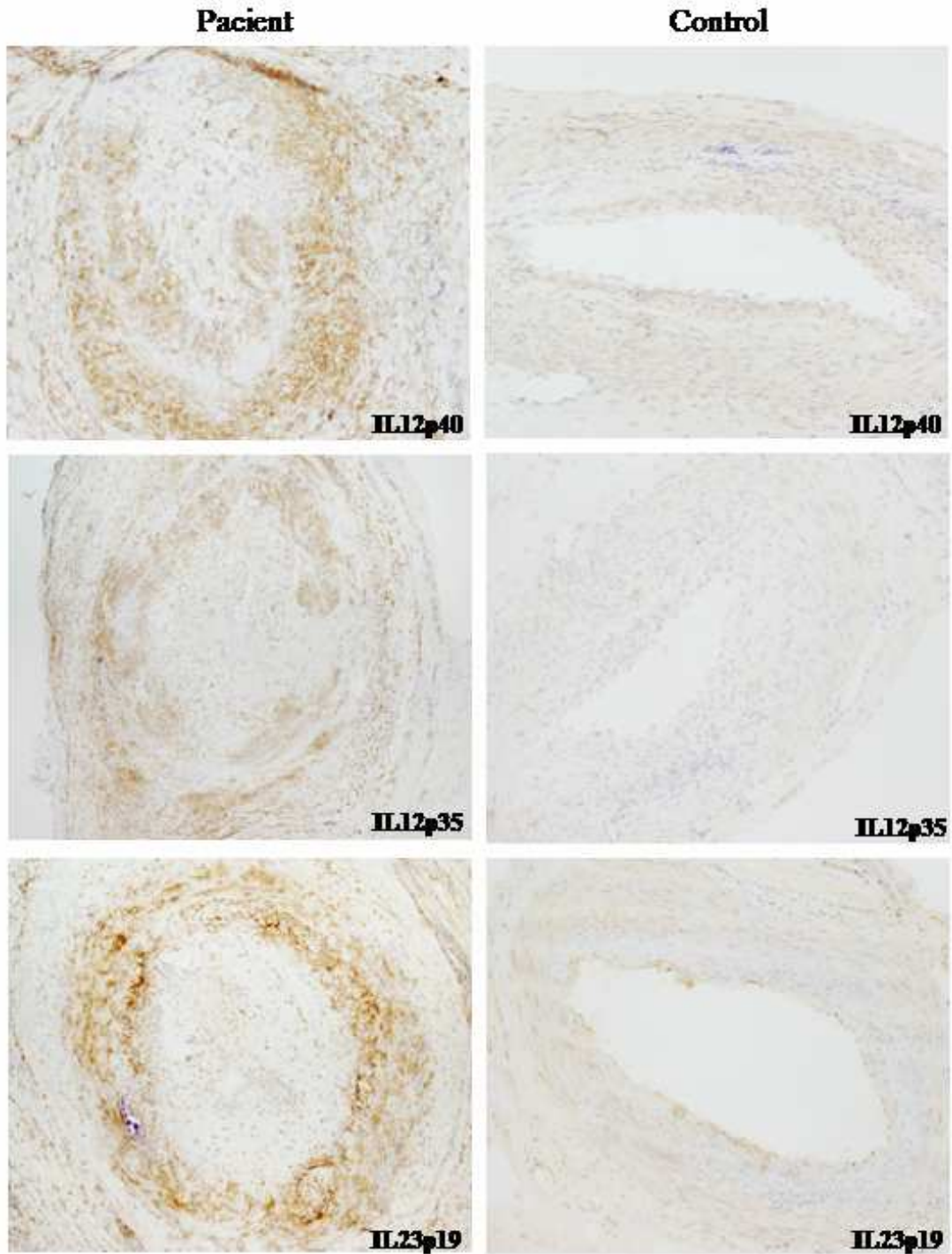
Figura 8. Expressió en l'artèria temporal de IL-12p40 (A), IL-12p35 (B) i IL-23p19 (C) mRNA. Comparació entre controls i pacients, destacant un augment significatiu en les lesions inflamatòries de les subunitats p40 i p19.



1B. Detecció de l'expressió proteica de IL-12 p40, IL-12 p35 i IL-23 p19 en les biòpsies d'artèria temporal

Davant els resultats obtinguts amb RNA, es va comprovar l'expressió proteica d'aquestes citocines a nivell arterial mitjançant immunohistoquímica. A la figura 2 podem veure la diferència d'expressió d'aquestes citocines comparant artèries positives de pacients amb ACG i de controls. Especialment IL-12p40 i IL-23p19 es troben clarament expressades en les zones amb major activitat inflamatòria de les artèries positives.

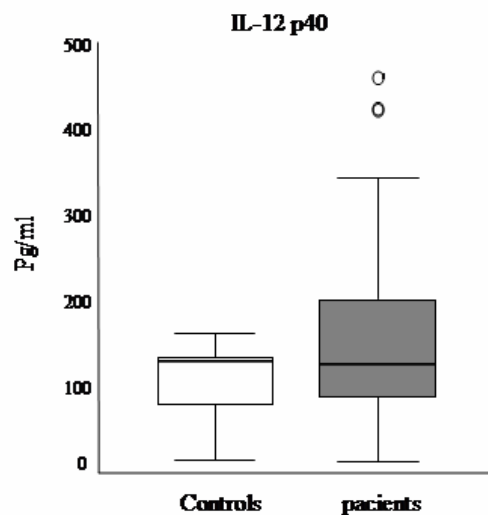
Figura 9. Expressió proteica de IL-12p40, IL-12p35 i IL-23p19 en artèries temporals. Comparació entre pacients i controls. Destaca la presència de p40 i p19 en l'àrea més inflamatòria.



1C. Detecció en el plasma de IL-12, IL-12 p40, IL-23 p19

Per aquesta part del projecte hem utilitzat plasma (citrat) de 33 pacients no tractats i 7 controls. Amb les mostres estudiades no es va poder quantificar ni la IL-12 ni la IL-23 per estar per sota del límit de detecció. Pel que fa a la p40 vam observar millor nivell de detecció i tot i que les diferències no són significatives hi ha una tendència a què els nivells siguin una mica més alts en els pacients que en els controls (Figura 10). Donat que tan IL-12 i la IL-23 totals han estat indetectables, una possibilitat que explicaria aquest resultat és la presència d'homodímers de p40 amb activitat biològica.

Figura 10. Expressió de IL-12p40 en plasma . Comparació entre controls i pacients sense diferències significatives. IL-23 i IL-12 van estar per sota el dintell de detecció.



1D. Relació entre els nivells de RNA d'IL-12 i IL-23 i les característiques fenotípiques dels pacients.

Amb els resultats anteriors en els què vam comprovar l'augment significatiu de RNA p40 i p19 en les lesions de l'ACG, vam voler estudiar si hi havia alguna relació entre aquests nivells i les característiques fenotípiques dels pacients, pel que vam mirar la seva correlació amb diferents paràmetres de la malaltia: símptomes cranials, polimiàlgia reumàtica, símptomes sistèmics i complicacions isquèmiques. En cap dels casos i tal com es resumeix en la taula 2, vam trobar una relació significativa, malgrat destacava una clara tendència de la p19 a estar més elevada en els pacients que presentaven més símptomes sistèmics respecte els que no.

Taula 2. Relació entre IL-12 i IL-23 i les característiques fenotípiques dels pacients

mRNA unitats relatives	IL-12-p40	IL-12p35	IL-23 p19
Síntomes cranials			
Presentes	3.98 ± 1.75	14.24 ± 4.75	22.39 ± 4.62
Absents	4.96 ± 0.30	17.23 ± 2.20	18.89 ± 3.34
p	0.057	0.15	0.23
Polimiàlgia reumàtica			
Presentes	4.25 ± 0.84	21.65 ± 0.95	35.74 ± 10.3
Absents	4.67 ± 1.3	16.17 ± 1.22	19.27 ± 4.22
p	0.68	0.35	0.43
Síntomes sistèmics			
Presentes	4.16 ± 1.56	22.03 ± 5.07	41.46 ± 12.7
Absents	4.72 ± 0.75	15.46 ± 1.93	17.79 ± 3.7
p	0.64	0.24	0.055
Complicacions isquèmiques			
Presentes	3.20 ± 1.05	11.21 ± 1.83	16.21 ± 7.01
Absents	4.89 ± 0.89	19.38 ± 2.73	29.18 ± 6.47
p	0.14	0.071	0.6

1E. Relació de la IL12 i la IL23 en la persistència de l'ACG

Comprovada la sobreexpressió d'aquestes interleucines en l'ACG, ens vam plantejar si podien tenir un paper important en el manteniment de la inflamació i persistència de la malaltia, pel que vam analitzar la seva relació amb dos factors importants: els rebrots i els requeriments terapèutics.

Pel que fa als rebrots vam comparar el contingut de p40, p35 i p19 RNA entre els pacients que no havien presentat cap rebrot o només un, amb pacients que n'havien presentat dos a més. Els resultats que es presenten a la taula 3, no van mostrar relacions significatives entre els nivells d'aquestes interleucines i el número de rebrots dels pacients.

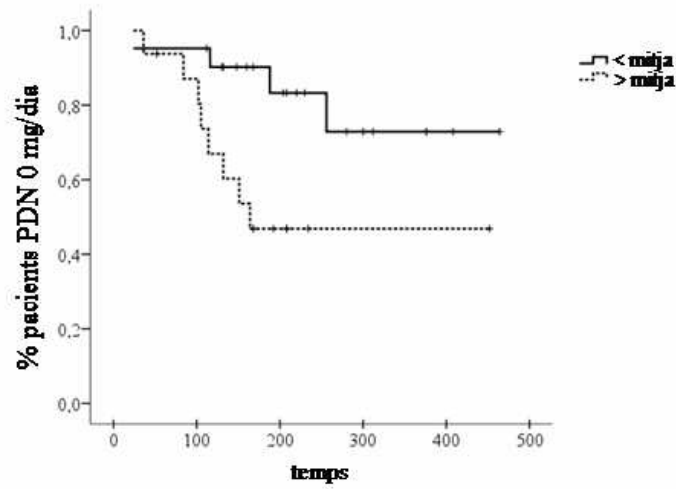
El segon que vam estudiar va ser com hem esmentat anteriorment, la possible relació entre els requeriments terapèutics i els nivells d'IL-12 p40, IL-12 p35 i IL-23 p19. Per fer-ho, vam comparar el nivells de RNA entre els pacients que després de 3 anys estaven o no en tractament. També vam analitzar el percentatge de pacients que havien assolit la dosi de prednisona de manteniment ($\leq 10\text{mg/dia}$) al llarg de 200 setmanes i el tant per cent de pacients que havien pogut abandonar el tractament amb el temps de seguiment. De tots aquests resultats només vam trobar una relació significativa ($p=0.22$) en el cas de la subunitat p40. Sorprenentment els pacients amb nivells més elevats de p40 abandonen abans el tractament tal com es veu en la figura 11. Per la subunitat p19 detectem la mateixa tendència.

Així doncs, malgrat no vam poder demostrar una clara relació entre l'evolució i persistència de la malaltia i els nivells de les interleucines 12 i 23 pel que fa als rebrots, pel que fa al requeriment terapèutic destaca que els pacients que poden abandonar el tractament abans sense presentar recaigudes són els que tenen nivells més alts de la subunitat p40.

Taula 3. Relació entre els nivells de RNA de IL-12 i IL-23 i el rebrots

Rebrots			
mRNA unitats relatives	0-1	2 o més	p
IL-12 p40	7.42 ± 1.64	0.92 ± 0.30	0.058
IL-12 p35	7.67 ± 3	5.67 ± 1.3	0.67
IL-23 p19	5.32 ± 1.25	7.69 ± 2.9	0.28

Figura 11. Percentatge de pacients que poden arribar a abandonar el tractament amb un temps de seguiment de 500 setmanes. Destaca que els pacients amb nivells més elevats de p40 (>mitja) assoleixen abans aquest objectiu.



1F. Correlació entre la IL-23 i la IL-17

Com hem vist en la introducció, la diferenciació de les cèl.lules Th17 requereix de la presència de la IL-23. Sabem per la literatura que ambdues interleucines estant íntimament relacionades i que s'ha arribat a parlar de l'axis IL23/IL17 en algunes malalties inflamatòries cròniques. Per aquest motiu, sumat al fet que havíem comprovat com la IL-23 es trobava augmentada en l'ACG, vam estudiar els nivells de mRNA de la IL-17 trobant una correlació positiva significativa ($p < 0.01$) amb la IL-23 (taula 4). Aquest fet ens va motivar a aprofundir també en el possible rol de la IL-17 en aquesta malaltia.

Taula 4. Correlació positiva entre IL-23 i IL-17

Rho de Spearman		IL-17	p19	
IL-17	Coeficient de correlació	1,000	,397*	
	Significació bilateral	.	0,008	
	N	45	44	
p19	Coeficient de correlació	,397*	1,000	
	Significació bilateral	0,008	.	
	N	44	44	

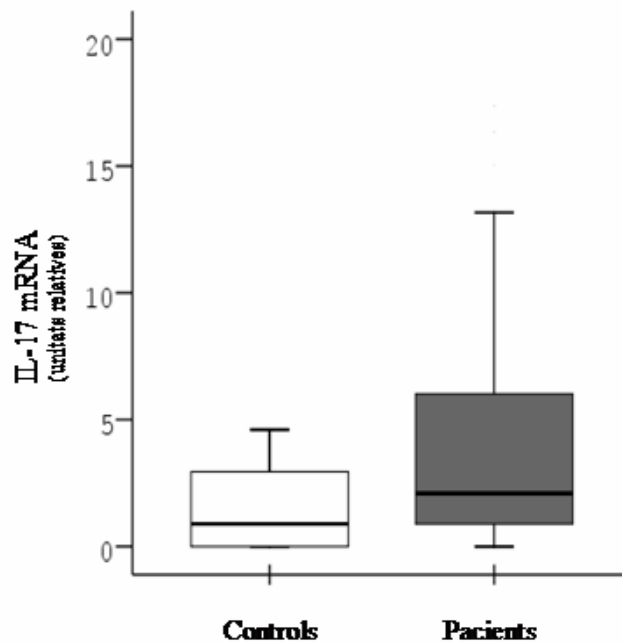
*La correlació és significativa al nivell 0,01 (bilateral)

2) Expressió de la interleucina IL-17 en l'ACG

2A. Detecció IL17 mRNA en les biòpsies d'artèria temporal

Com es pot veure en la figura 12 i d'acord amb la correlació que havíem vist amb la IL-23, el contingut de IL-17 mRNA en els pacients, és significativament més abundant que en els controls (6.22 ± 8.61 vs 2.50 ± 3.90 relative units; $p = 0.016$).

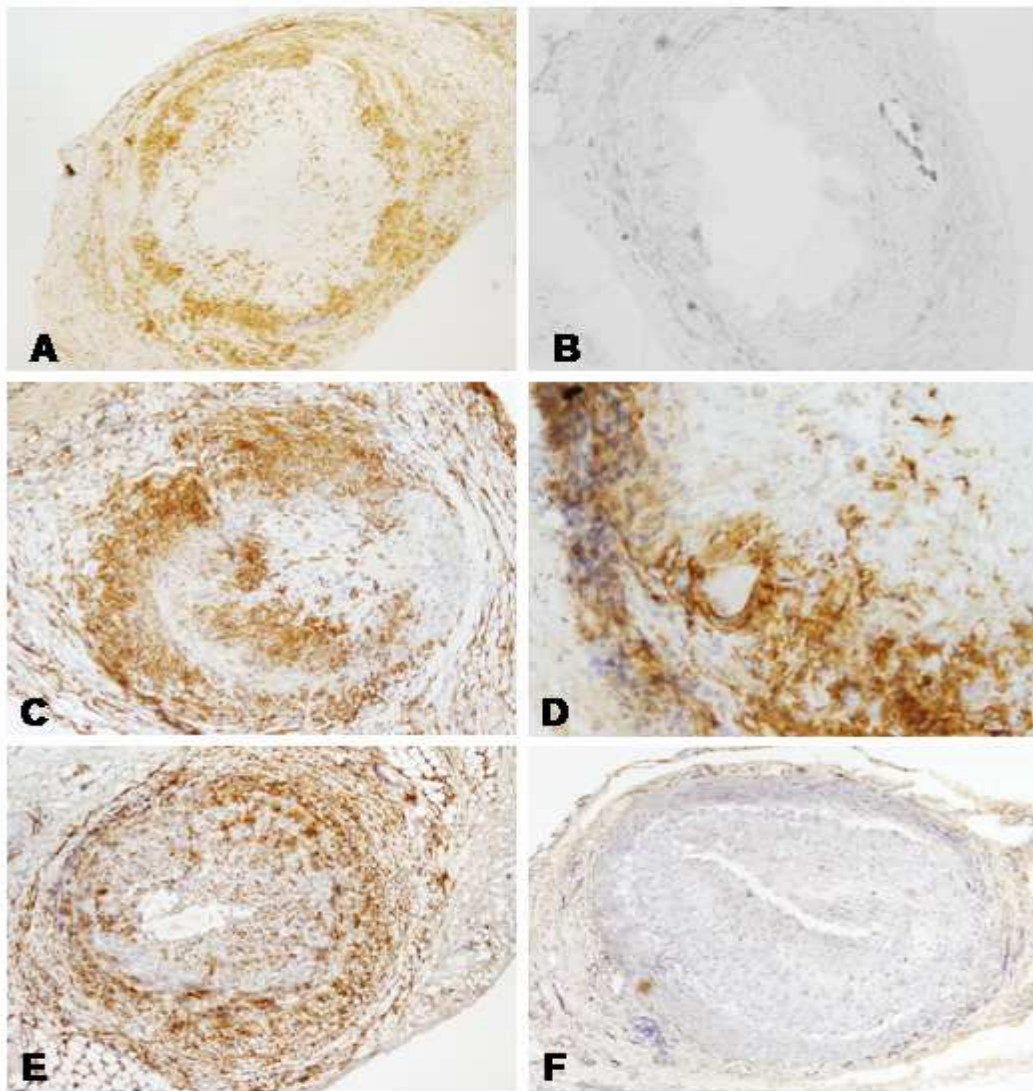
Figura 12. Expressió en l'artèria temporal de IL-17 mRNA. La comparació entre controls i pacients mostra que la IL-17 està significativament elevada en l'ACG.



2B. Detecció de l'expressió proteica de IL17 en les biòpsies d'artèria temporal

Tal i com havíem fet amb la IL-12 i la IL-23, davant els resultats obtinguts amb el RNA de la IL-17, vam voler comprovar l'expressió de proteïna en les artèries dels pacients amb ACG. A la figura 13 es compara una artèria positiva (A) amb una negativa (B). C i D mostren que no només l'artèria principal presenta IL-17, sino també una colateral inflamada. E i F mostren les biòpsies d'un mateix pacient en el moment del diagnòstic i un any després, on es pot veure clarament el canvi que ha sofert l'artèria juntament amb la desaparició de la presència de IL-17.

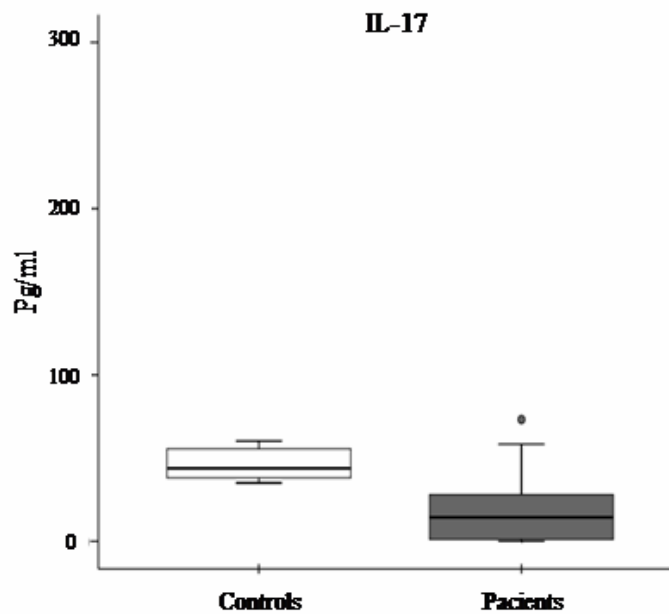
Figura 13. Expressió proteica de IL-17 en artèries temporals. A. Artèria d'un pacient amb ACG. B. Artèria d'un control. C. Colateral inflamada. D Ampliació zona inflamatòria. E. Biòpsia positiva d'un pacient amb ACG abans de l'inici del tractament. F. Biòpsia del mateix pacient un any després.



1C. Detecció en el plasma de la IL-17

Tal i com també va passar amb els nivells en plasma de la IL-23, la majoria de resultats per la IL-17 van ser indetectables o en el dintell de detecció de la tècnica (15 pg/ml). ($46.65 \pm 10,27$ vs 18.84 ± 19.09 pg/mL; $p < 0.001$)

Figura 14. IL-17 en plasma. Nivells per sota o en el dintell de detecció.



2D. Relació entre els nivells de RNA d'IL-17 i les característiques fenotípiques dels pacients.

En aquest cas també vam voler estudiar la possible relació entre els nivells de IL-17 mRNA i diversos paràmetres clínics dels pacients (símptomes cranials, polimiàlgia reumàtica, símptomes sistèmics i complicacions isquèmiques). Tal com havíem vist amb la resta d'interleucines estudiades, per la IL-17 tampoc vam trobar una correlació significativa amb cap dels paràmetres estudiats (Taula 5).

Taula 5. Relació de la IL-17A i les característiques fenotípiques dels pacients

IL-17A mRNA unitats relatives (mean± SEM)			
	Present	Absent	p
Símptomes cranials	7.42 ± 1.64	0.92 ± 0.30	0.058
Polimiàlgia reumàtica	7.67 ± 3	5.67 ± 1.3	0.67
Símptomes sistèmics	5.32 ± 1.25	7.69 ± 2.9	0.28
Complicacions cranials isquèmiques	11.20 ± 4.18	5.16 ± 1.4	0.31

2E. Relació de la IL-17 en la persistència de la l'ACG

Comprovada la sobreexpressió de IL-17 en l'ACG, ens vam plantejar si aquesta interleucina pot tenir un rol important en la persistència de la malaltia, pel que vam analitzar, tal com havíem fet prèviament amb la IL-12 i la IL-23 la seva relació amb dos factors rellevants en aquest sentit: els rebrots i els requeriments terapèutics.

Vam comparar el contingut de IL-17 mRNA a nivell tissular entre pacients que no havien presentat cap rebrot o només un, amb pacients que n'havien presentat dos o més. Els nivells de IL-17 mRNA van presentar la tendència de ser més elevats en aquells pacients que havien presentat remissió sostinguda (7.46 ± 973 vs 3.19 ± 3.70 relative units; $p = 0.058$). Amb aquest mateix propòsit vam obtenir proteïna procedent de l'artèria en 7 pacients (5 pacients amb més de 2 rebrots i dos pacients sense rebrots) i mitjançant ELISA vam comprovar com els nivells de IL17 també eren més alts en els pacients que no havien presentat mai rebrots ($19, 30 \pm 29.96$ vs 0.68 ± 0.63 pg/mL; $p = 0.095$). Podem veure aquests resultats en la figura 15 (A i B).

Pel que fa als requeriments terapèutics, vam analitzar l'efecte del tractament amb glucocorticoides en els nivells de mRNA d'aquesta interleucina, comparant pacients no tractats ($n=38$) versus pacients amb dos o més dies de tractament ($n=19$). En aquest cas vam observar com els pacients tractats, tenien nivells de IL-17 molt similars als controls de la figura 11 (6.22 ± 8.61 vs 1.74 ± 2.48 relative units; $p = 0.017$) (Figura 15 C).

També vam estudiar la diferència en IL17mRNA entre els pacients que després de 3 anys seguien o no en tractament. Els nivells més alts van ser pels pacients que passat aquest temps ja no requerien corticoides (5.17 ± 8.11 vs 0.29 ± 0.46 ; $p= 0.06$) (Figura 15 D). També hem comprovat com de forma significativa ($p < 0.04$), en un seguiment de 200 setmanes, els pacients amb nivells més alts de IL-17 mRNA assolien abans la dosi de manteniment de prednisona ($\leq 10\text{mg/dia}$) i de forma similar, els pacients amb nivells més alts de IL17 mRNA de forma també significativa ($p < 0.028$) podien abandonar el tractament abans que els que presenten nivells més baixos de IL17. (Figura 16 A i B respectivament).

Aquests van ser resultats un tan sorprenents ja que en resum, mostren com nivells més alts de IL-17 en el moment del diagnòstic s'acompanyen d'una millor evolució dels pacients, amb tendència a presentar menys rebrots i podent retirar el tractament de forma més precoç de forma significativa. A favor d'aquesta observació també veiem com els nivells de RNA disminueixen amb el tractament i en la immunohistoquímica, com en la segona biòpsia al cap d'un any, la IL-17 havia desaparegut en la seva totalitat.

Figura 15. A. Relació del contingut de IL-17 mRNA amb la presència de rebrots. B. ELISA per IL-17 a nivell arterial, comparant pacients amb rebrots i sense. C. Comparació dels nivells de IL-17mRNA entre pacients sense tractament i pacients amb dos o més dies de tractament. D. Nivells de IL-17 mRNA i tractament als 3 anys.

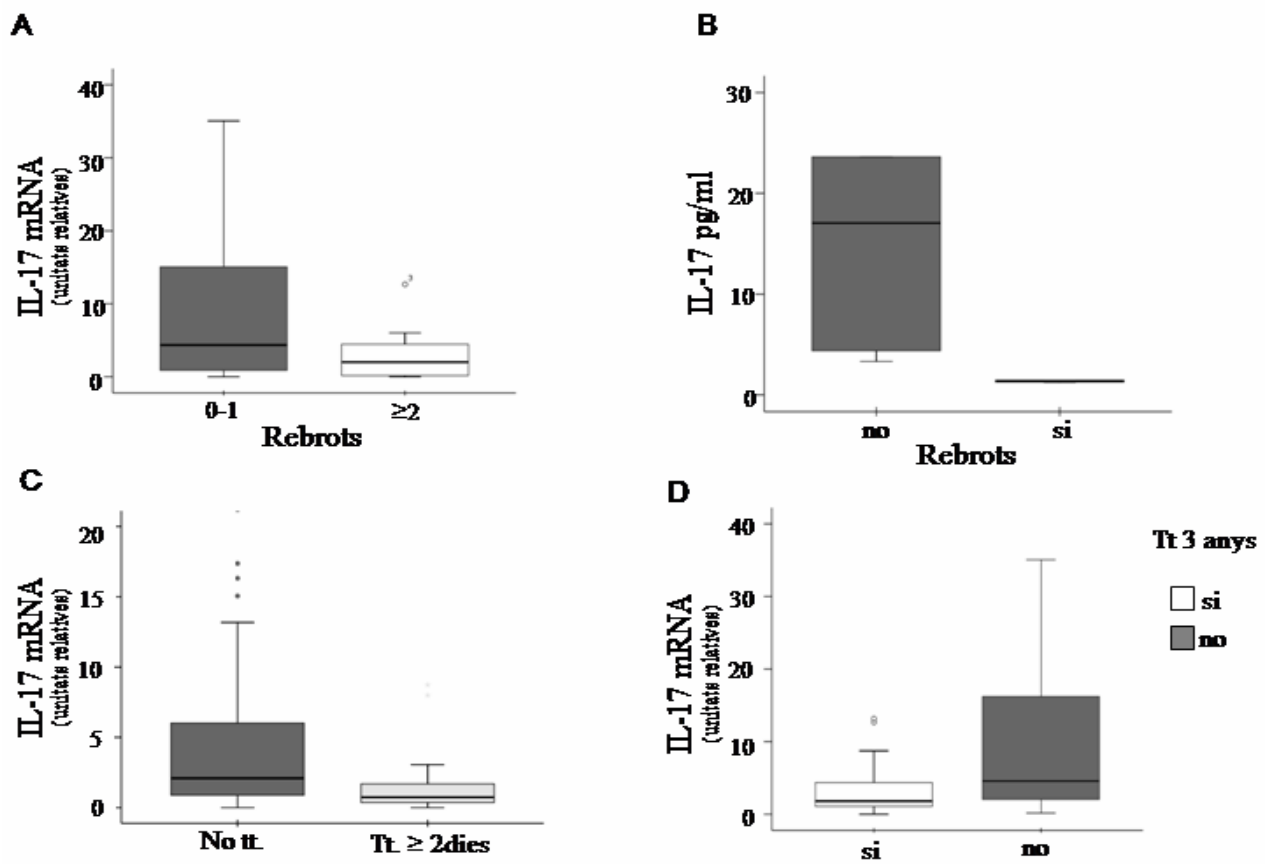
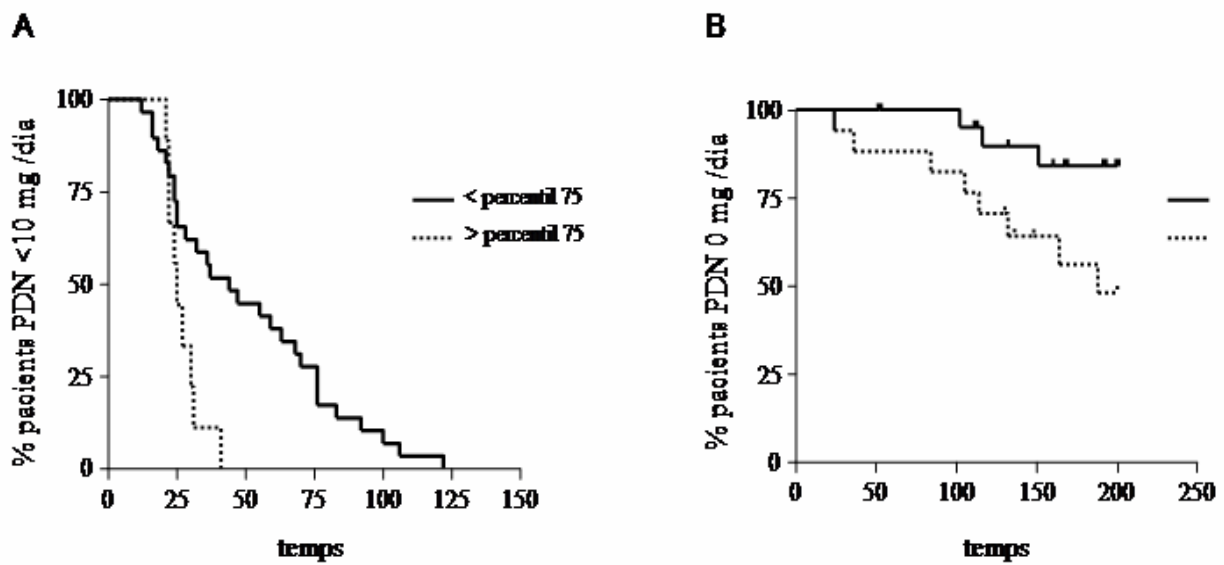


Figura 16. A. Percentatge de pacients que assolixen la dosi de manteniment de PDN ≤ 10 mg/dia (temps de seguiment 150 setmanes). Els pacients amb nivells més elevats de IL-17mRNA (>percentil 75) arriben abans a aquesta dosi de manteniment. B. Percentatge de pacients que poden arribar a abandonar el tractament amb un temps de seguiment de 250 setmanes. Destaca que els pacients amb nivells més elevats de IL-17mRNA (>percentil 75) assolixen abans aquest objectiu.



En el següent apartat descrivim les possibles funcions proinflamatòries de la subunitat p19 a nivell de l'endoteli des d'un punt de vista experimental . Els motius que ens hi van conduir són:

1) D'una banda l'expressió augmentada d'IL-23 en les lesions inflamatòries de l'ACG.

2) L'estudi de Wiekowski et. al on els ratolins transgènics per p19 presentaven inflamació sistèmica amb evidència de vasculitis histològica en vasos petits. (*Wiekowski 2001*)

3) Està descrit que l'inici de la resposta inflamatòria en l'ACG té lloc als petits vasos de l'adventícia des d'on s'expandeix a la resta de la paret arterial.

4) L'endoteli és el punt d'arribada de les cèl.lules inflamatòries. Amb diverses funcions pro-inflamatòries: (*Pober 2007*)

1) productor de citocines: IL-1 , IL-6

2) reclutament de cèl.lules inflamatòries a través de la producció de : quimiocines (CXCL8, MCP-1), mol.lècules d'adhesió (ICAM, VCAM) i transmigració (PECAM-3)

3) angiogènesi (en la inflamació crònica). Formació de nous vasos sanguinis que afavoriran el reclutament de més leucòcits perpetuant la inflamació.

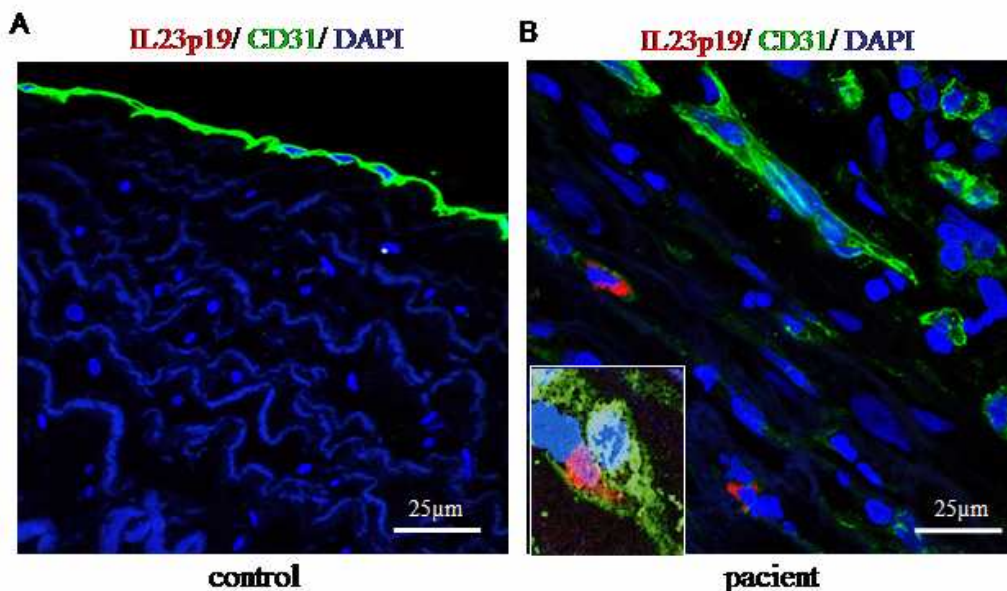
5) El coneixement de que amb l'estimulació de TNF α les cèl.lules endotelials produeixen mRNA p19 (*Oppmann 2000*).

3) Expressió i funció de la IL-23 a nivell endotelial

3A. Expressió endotelial de la p19 en l'ACG.

Per estudiar la relació de la IL-23 p19 i les cèl.lules endotelials a nivell de l'artèria temporal, vam fer immunofluorescència en una artèria normal i una patològica buscant la co-expressió d'IL-23p19 i CD31 com a marcador endotelial. Tal com s'observa en la figura 17 (A) a l'artèria control no hi ha rastre de p19 i el CD31 marca perfectament la línia de l'endoteli. En la patològica (Figura 17B) observem la pèrdua d'estructura de la paret de l'artèria, destacant l'expressió en alguna cèl.lula de p19 (en vermell) conjuntament amb CD31 (en verd).

Figura 17 .Immunofluorescència per CD31 i IL23p19. A. Artèria control. B Artèria patològica.

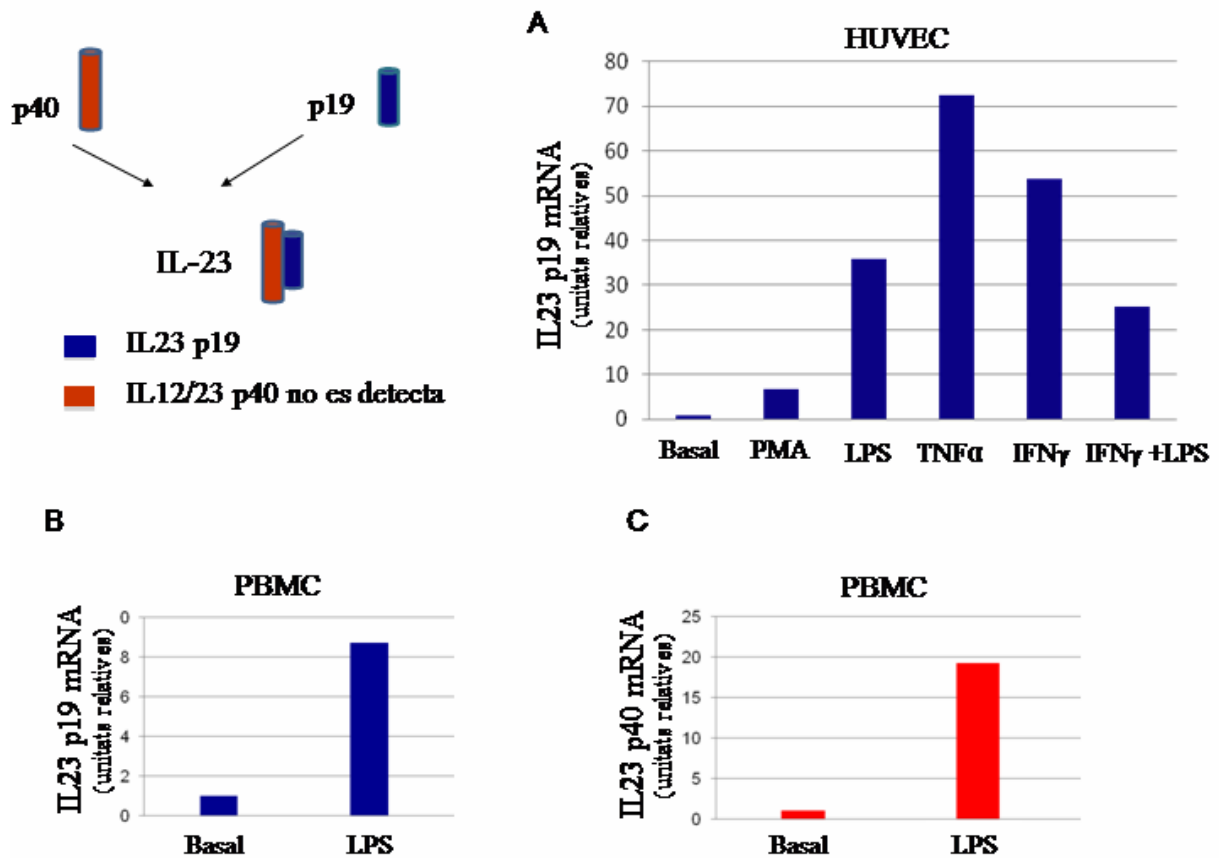


3B. Inducció de la producció d'IL-23 RNA en les cèl.lules endotelials.

Coneixedors per la literatura de que les cèl.lules endotelials són capaces de produir IL-23 p19 mRNA amb l'estímul de TNF α , vam proposar-nos estudiar com responien aquestes cèl.lules a aquest i a d'altres estímuls inflamatoris. Alguns d'ells presents en l'ACG com l'INF γ i també estimuladors dels TLRs (LPS) que sabem es detecten en les cèl.lules dendrítiques adventicials i poden ser responsables de la seva maduració com a APCs i per tan ser el punt d'inici de la inflamació de la malaltia tal com s'explica a l'apartat d'introducció. Com es pot veure a la figura 18 A, vam trobar que lligands dels TLRs com LPS i també l' IFN γ i òbviament el TNF α eren capaços d'estimular la producció d'IL-23 p19 mRNA per part de les cèl.lules endotelials. A la figura 18 B i 18 C es mostra la producció d'IL-23 per part de cèl.lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) després de l'estimulació amb LPS. Destaca la producció d'ambdues subunitats p19 i p40 a diferència del que succeeix amb les cèl.lules endotelials, on cap d'aquests estímuls inflamatoris va ser capaç d'induir la producció de p40.

També vam voler comprovar la presència o no del receptor de la IL-23 en les cèl.lules endotelials. Ambdues cadenes del receptor s'expressen en els PBMC (d'acord amb el que diu literatura). A les HUVEC la cadena IL23R no es detecta, tampoc la IL12R β 1 en condicions basals, tot i que uns mínims nivells semblen expressar-se després de l'estimulació amb LPS, PMA o TNF α (Taula 6).

Figura 18. A Producció d'IL-23p19 mRNA per part de les cèl.lules endotelials. Destaca la no inducció de la subunitat p40. B i C. Producció d'IL-23 (ambdues subunitats) per part de PBMC després de la inducció amb LPS (1 ug/ml).



Taula 6. Expressió del receptor de la IL-23 a nivell endotelial

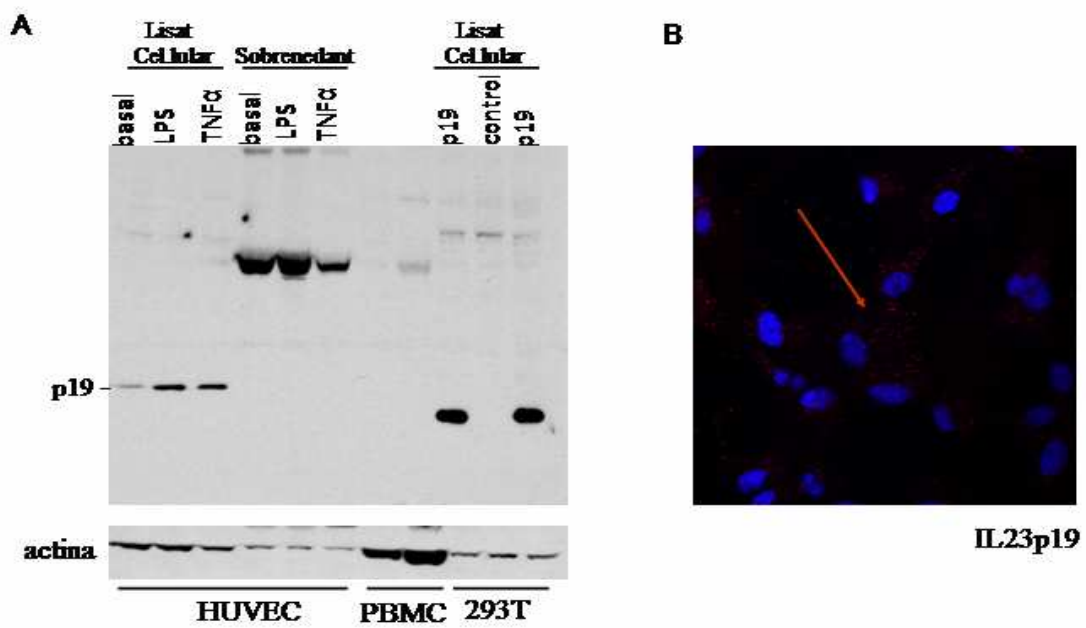
	HUVEC	PBMC
IL12R β 1	Nivells molt baixos*	Si
IL23R	No	Si (menys que IL12R β 1)

*Aparentment no hi ha producció en situació basal, però es detecten nivells molt baixos després de l'estimulació per part de LPS, PMA i TNF α . IL23 R no s'indueix.

2B. Detecció de l'expressió proteica d'IL-23 p19 en les cèl.lules endotelials

Una vegada comprovada l'expressió de p19 mRNA, vam voler estudiar l'expressió proteica d'aquesta citocina en les cèl.lules endotelials. Tal com mostra la figura 19 (A) per western blot vam detectar una banda corresponent als lisats cel.lulars endotelials lleugerament per sobre del pes molecular esperat (18.5) i del control positiu (lisats cel.lulars de 293T transfectades per lentivirus p19) . Una possible explicació per aquest fet podria ser una O-glicosilació descrita prèviament en la literatura (Oppmann et al Immunity 2000). També per immunofluorescència, tot i que de forma poc intensa, podem veure la presència de grànuls en el citoplasma de les cèl.lules endotelials positius per la tinció amb p19 quan aquestes han estat prèviament estimulades amb TNF α (Figura 19 B).

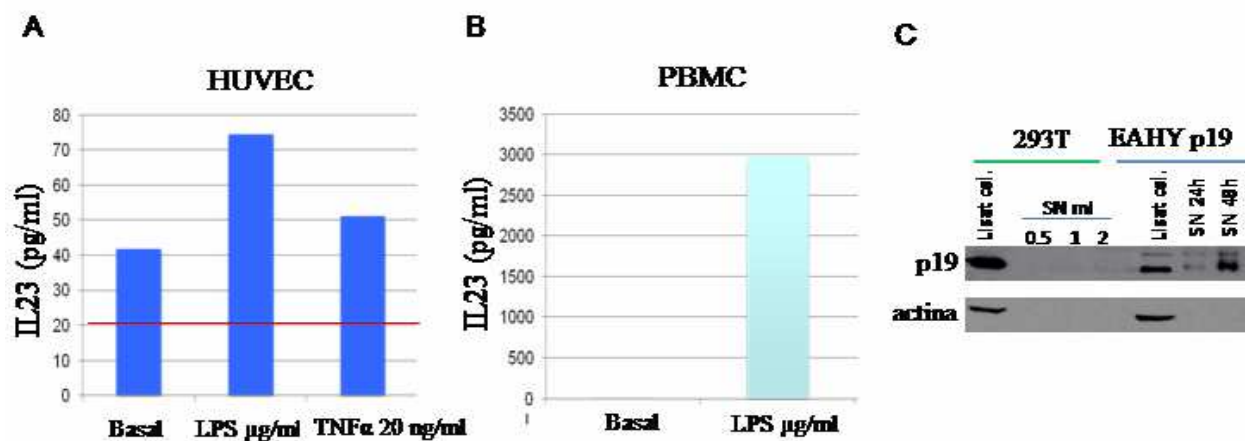
Figura 19. A. W-B on observem banda al voltant de 20 kDa corresponent als lisats de les cèl.lules endotelials. El control positiu serien les dues bandes corresponents a cèl.lules 293T transfectades amb el LVp19. B. Immunofluorescència d'IL-23 p19 en cèl.lules endotelials després de la seva estimulació durant 24h amb TNF α .



3C. Secreció d'IL-23 p19 per part de les cèl.lules endotelials

Pel que fa a la secreció d'aquesta subunitat, el que se sap fins ara per la literatura (Oppmann et al Immunity 2000) és que com hem exposat anteriorment, requereix la presència de la subunitat p40 per ser alliberada. De tota manera ens vam proposar estudiar per ELISA i a partir de la precipitació de sobrenedants per western-blot, la possible detecció de p19 en els sobrenedants dels cultius de les cèl.lules endotelials. Tal com mostra la figura 20A queda clara la secreció d'IL-23p19 per part de PBMC (control positiu) després de l'estimulació amb LPS. Pel que fa a les cèl.lules endotelials, en cultius de 48 hores detectem una mínima quantitat de p19 sobretot després de l'estimulació amb LPS (Figura 20B). Per Western-Blot calen grans quantitats de sobrenedant precipitat de cèl.lules endotelials (EAHY926) infectades per p19, per detectar-ne la presència tal i com es mostra en la figura 20C.

Figura 20. A i B. ELISA IL-23. A. Sobrenedant de cèl.lules HUVEC cultivades durant 48 hores de forma basal i amb LPS 1ug/ml i TNF α 20 ng/ml. La línia vermella senyala el límit de detecció de la tècnica. B. Secreció d'IL-23 per part dels PBMC després de l'estimulació amb LPS 1ug/ml. C. W-B on s'observa banda pels lisats cel.lulars de les cèl.lules 293T transfectades amb el LVp19 i per les EAHY926 infectades amb el vector de la p19. També s'observen dues bandes corresponents a la precipitació dels sobrenedants dels cultius de les EAHY926 durant 24h i 48h.



3D. Funcions biològiques de la IL-23 p19 a nivell endotelial en un context inflamatori

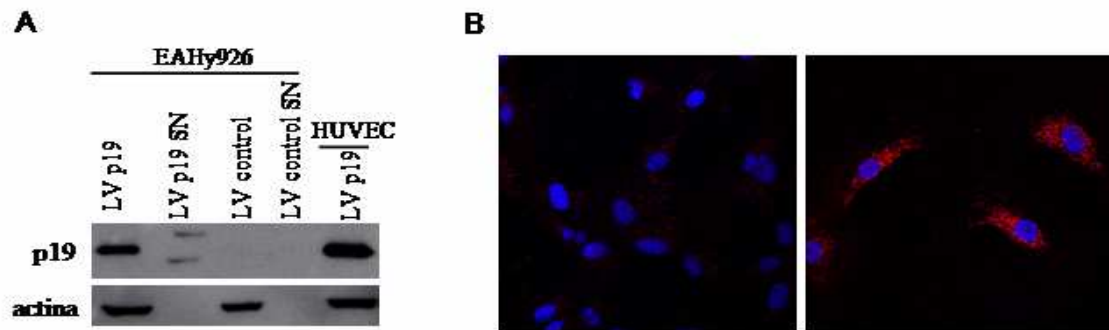
En aquest apartat ens vam centrar en les dues funcions inflamatòries de l'endoteli que hem esmentat anteriorment: 1) el reclutament de cèl.lules inflamatòries i 2) la producció de citocines.

Concretament vam estudiar si la sobreexpressió de p19 en les cèl.lules endotelials afectava aquestes funcions en algun sentit. Tots els resultats que venen a continuació són resultats preliminars que d'alguna manera reforcen la idea de que la p19 pot tenir activitat biològica en aquestes cèl.lules i obren un camí fins ara inexplorat, però com discutirem més endavant es requereixen estudis més amplis i confirmatoris per extreure'n conclusions fermes.

3D 1. Infecció de les cèl.lules endotelials HUVEC i EAHY96 amb el lentivirus. Sobreexpressió d'IL-23 p19.

Per portar-ho a terme primer ens va caldre sobreexpressar la p19 mitjançant la infecció amb el lentivirus i el plàsmid IL-23p19 i el seu control PLVX en dues línies cel.lulars (HUVEC i EAHY926). A la figura 21 es mostra la comprovació per W-B i per immunofluorescència del bon resultat de la infecció.

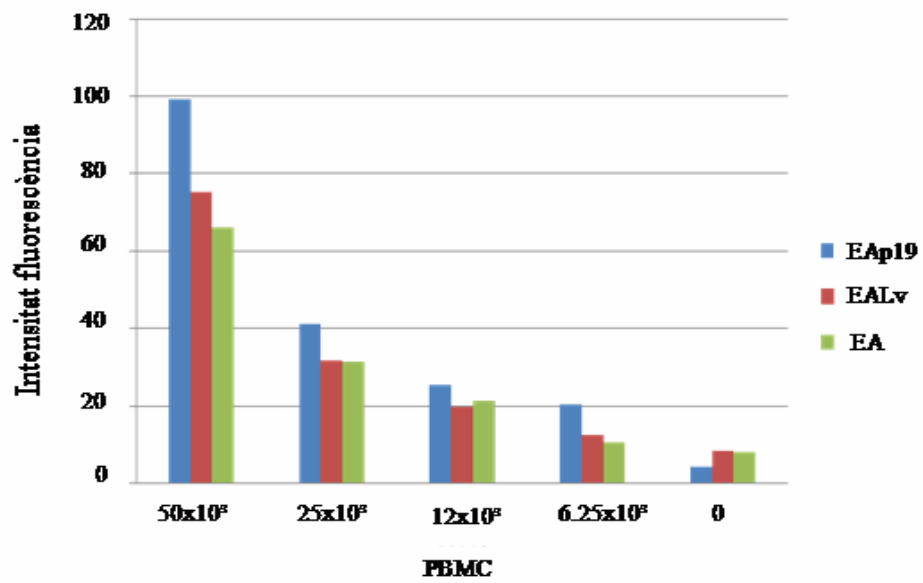
Figura 21. A. Western-Blot amb els lisats de les cèl.lules infectades per LVp19 i el seu control. B Immunofluorescència comparant cèl.lules HUVEC. A l'esquerra la presència de grànuls positius per p19 després de l'estimulació amb TNF α i a la dreta 24h després de la infecció del vector amb el lentivirus.



3D 2. Reclutament de cèl.lules inflamatòries. Adhesió de monòcits.

Una de les funcions més importants de l'endoteli és el reclutament de cèl.lules inflamatòries. És per aquest motiu que vam voler estudiar l'adhesió dels leucòcits en les cèl.lules endotelials amb sobreexpressió de p19. Es van purificar cèl.lules mononuclears de sang perifèrica marcades amb fluorescència i es van incubar en diferents concentracions (1h a 37°C) en una monocapa de cèl.lules EAHY926 que expressaven o bé p19, el seu control o no havien estat infectades. Després de diversos rentats per treure les cèl.lules no adherents es van analitzar les diferències amb un lector de fluorescència. Com mostra la figura 22 trobem que en totes les diferents concentracions, les cèl.lules mononucleades de sang perifèrica van mostrar un major grau d'adhesió per la monocapa EAHY926 p19 comparat amb els controls. Això doncs podria indicar que l'expressió de p19 en les cèl.lules endotelials podria afavorir l'adhesió de monòcits/macròfags en l'endoteli.

Figura 22. Adhesió de monòcits en una monocapa d'EAHY926 infectades amb p19, PLVX i parental. La gràfica mostra com en totes les diferent concentracions cel.lulars de PBMC el grau d'adhesió té tendència a ser major per la monocapa de cèl.lules que sobreexpressen p19



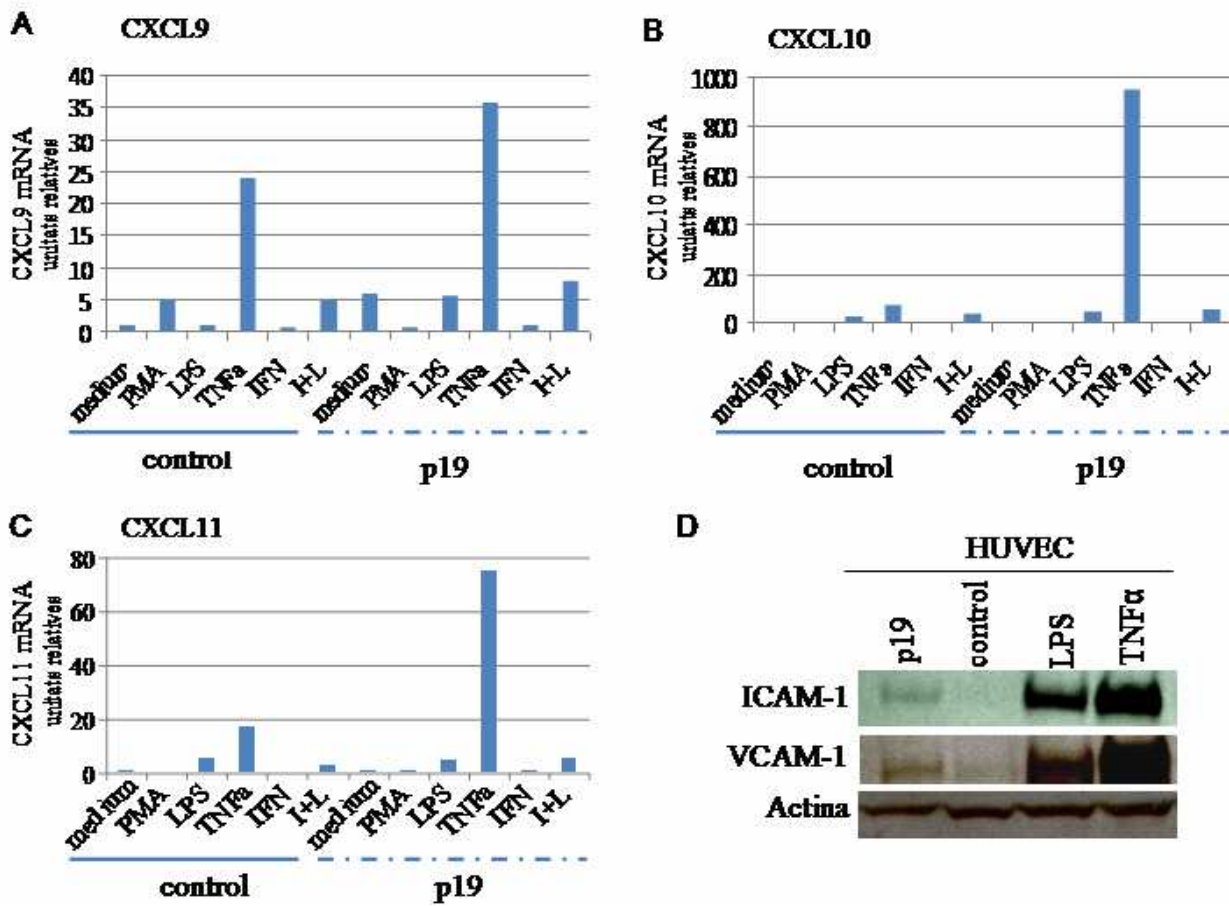
3D 3. Estudi de canvis en els gens inflamatoris de les cèl.lules endotelials després de la sobreexpressió de p19.

Després de l'experiment on sembla que l'adhesió de monòcits de sang perifèrica és major en la monocapa de cèl.lules infectades per p19 que en els controls, vam voler estudiar les quimiocines CXCL9, CXCL10 i CXCL11 i el seu receptor CXCR3, implicats en la quimiotaxi dels leucòcits. Tot i que no vam detectar canvis en el receptor, va destacar l'augment per RT-PCR de les tres quimiocines per part de les cèl.lules infectades per p19 després des ser estimulades amb TNF α , tal i com es motra a la figura 23.

A més d'aquestes quimiocines es van estudiar un nombre considerable de gens inflamatoris que sabem les cèl.lules endotelials poden produir en determinades circumstàncies buscant diferències entre els controls i les cèl.lules infectades per p19 (HUVEC i EAHY926) en estat basal i després de ser estimulades per factors inflamatoris com TNF α , LPS i INF γ . En cap d'aquests casos es van trobar diferències significatives : CXCR4, CXCR7, CCL2, CDH5, SDF-1, VEGF, VEGFR2, FGF2, FGFR1, Jag2, Hey1, Hey2, DLL4, MMP1, MMP14, TIMP1, IL-6, IL-17, IL-17R, PECAM-1 i TGFb-1.

Seguint amb la idea de que la p19 pot afavorir el procés d'adhesió dels leucòcits a l'endoteli, ens vam proposar comprovar què passava amb dues importants molècules d'adhesió que també es troben augmentades en l'ACG, ICAM-1 i VCAM-1. En aquest cas, vam fer western-blott dels lisats cel.lulars de les cèl.lules HUVEC infectades per p19 i el seu control i com a controls positius vam utilitzar HUVEC estimulades amb LPS i TNF α tal com es mostra a la figura 21 D. Podem veure que tan per ICAM-1 com per VCAM-1 la presència de p19 augmenta la detecció d'aquestes molècules respecte el control.

Figura 23. A, B i C mostren l'augment de RNA de CXCL9, CXCL10 i CXCL11 en les cèl.lules endotelials amb sobreexpressió de p19 després de ser estimulades amb TNF α . D. W-B de la diferent expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1 i VCAM-1 entre HUVEC p19 i el seu control.



3E. Angiogènesi i p19

A la literatura hi ha algunes evidències que suggereixen un efecte pro-angiogènic de la IL-23, però el mecanisme queda poc clar. L'angiogènesi o formació de nous vasos és un procés complex que té molta rellevància tant en el càncer com en la perpetuació de la inflamació crònica. Perquè tingui lloc hi ha d'haver l'activació de molts factors pro-angiogènics i les cèl·lules endotelials hauran de patir múltiples transformacions. A nivell in vitro s'estudien alguns d'aquests passos: 1) proliferació 2) diferenciació 3) migració.

A continuació mostrem els resultats dels experiments realitzats amb les cèl·lules amb sobreexpressió de p19:

In vitro:

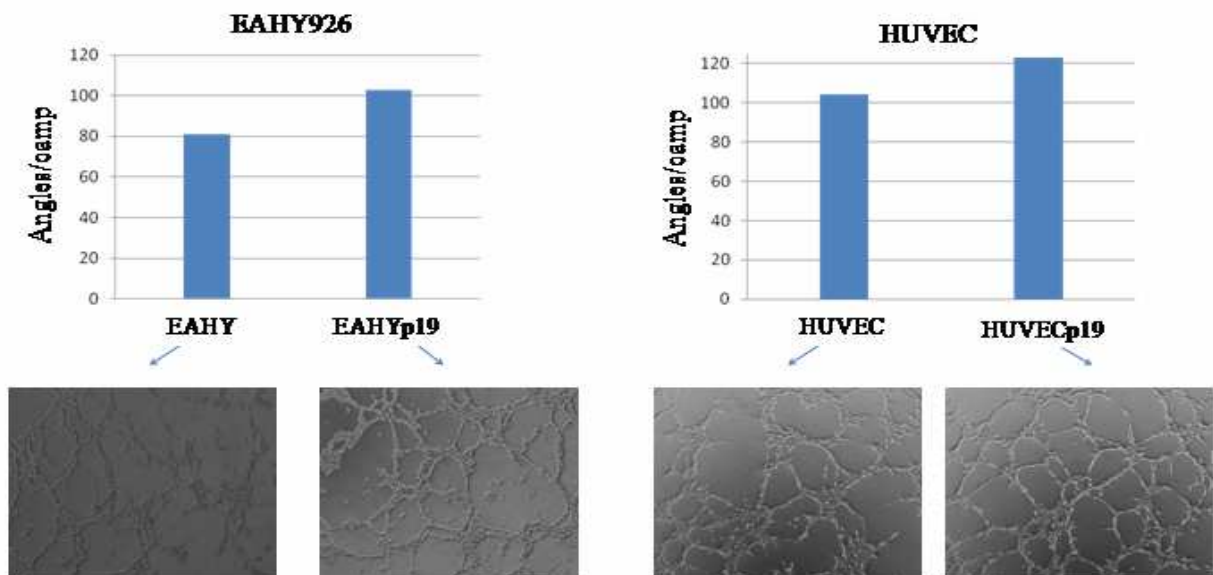
- 1) diferenciació: "Tub like structure."
- 2) migració: "scratch assay"

In vivo: assaig de Matrigel en ratolins.

3E.1 Diferenciació. Assaig de Matrigel in vitro

Per estudiar diferenciació vam realitzar un assaig in vitro que recapitula passos importants de les cèl·lules endotelials a l'hora d'unir-se i col·locar-se formant estructures vasculars, incloent adhesió a la matriu extracel·lular, la generació de gradients de quimiocines, polarització, formació de filopodies, migració cel·lular, unió cel·lula-cèl·lula i la formació d'una ordenada xarxa de cordons cel·lulars (*Salvucci 2002*). Aquest és un procés ben regulat, que compte amb molts passos i que inclou canvis dinàmics en la cèl·lula endotelial orquestrat per multitud de molècules. Vam fer l'experiment amb ambdós tipus cel·lulars endotelials (EAHY926 i HUVEC) amb resultats similars. Com es pot apreciar a la figura 24 la presència de p19 sembla que augmenta la tendència a formar cordons cel·lulars augmentant els angles d'intersecció respecte els controls.

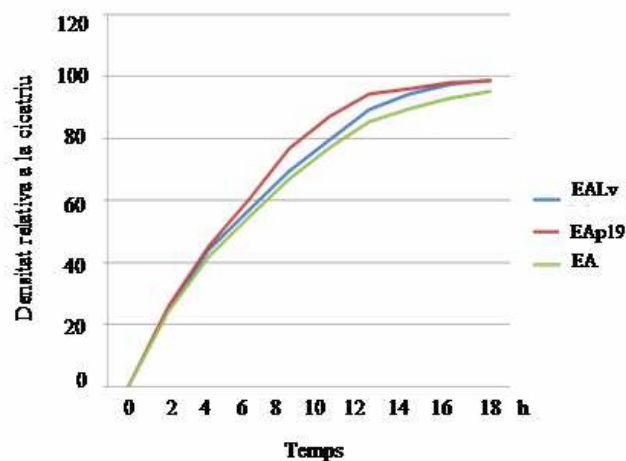
Figura 24. HUVEC i EAHY926 (15,000 cels/pou) es van sembrar en plaques de 48 cubertes prèviament amb Matrigel solidificat (BD Bioscience) i es van deixar incubant a 37°C 12h. Es van comptar els angles amb el microscopi. Es mostren imatges representatives de la formació dels cordons en els panells inferiors. Els resultats representen les mitjanes dels triplicats de tres experiments diferents.



3E.2. Migració. “Scratch assay”

També vam voler examinar si la sobreexpressió de p19 produïa un canvi en la motilitat de les cèl.lules i en la migració. Per això vam utilitzar una altre assaig in vitro de “wound healing”. Tal com mostra la gràfica de la figura 25 no hem trobat diferències per part de les cèl.lules amb sobreexpressió de p19 d’incrementar la seva motilitat i la seva capacitat de migració respecte els controls (PLVX i cèl.lules no infectades) en tancar l’escletxa a la placa després de 18 hores d’observació. Per estar segurs de que aquest efecte no es deu a diferències en la proliferació faria falta comparar el creixement d’aquestes cèl.lules.

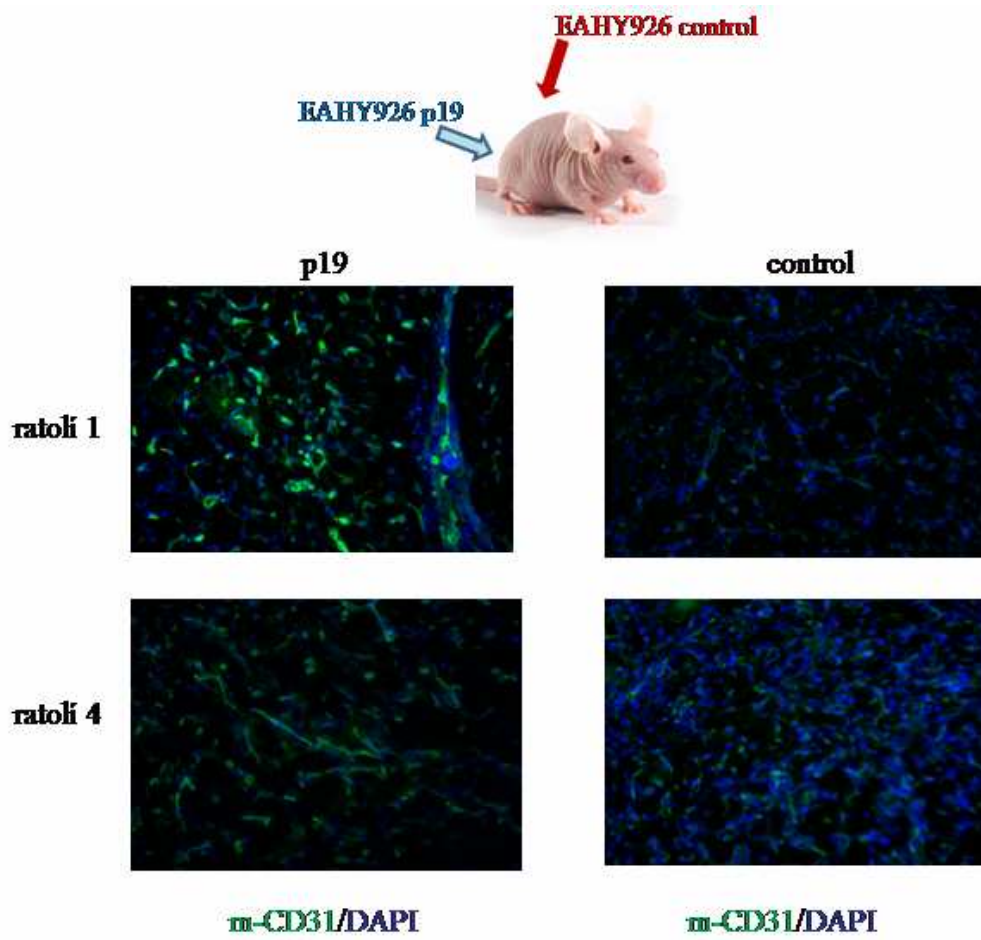
Figura 25. Scratch assay. No mostra diferències significatives entre les cèl.lules amb sobreexpressió de p19 i els seus cotnrols.



3E. 3. Assaig de matrigel in vivo

Per veure el possible efecte de la p19 directament sobre l'angiogènesi, vam utilitzar un model per la formació de vasos basat en Matrigel, en el qual vam injectar a 4 ratolins immunodeficients de forma subcutànea matrigel amb cèl.lules EAHY926 p19 (en un flanc) i amb cèl.lules control (a l'altre flanc). 10 dies després de la injecció vam extreure les plaques de matrigel i en vam fer talls histològics fent tinció per immunofluorescència per detectar les cèl.lules endotelials humanes (mitjançant un h-CD31 Ac específic, no es mostren imatges) i els vasos del ratolí (rat anti-mouse CD31; BD Pharmingen). En la figura 26 es mostra com en dos dels ratolins, la vasculatura marcada pel CD31 propi del ratolí és més incrementada en les plaques que contenien p19. Els talls histològics dels altres dos ratolins van ser de mala qualitat no podent extreure'n conclusions. Aquest és un resultat molt preliminar que només obriria la porta a ampliar l'estudi, potser simplificant-lo injectant p19 recombinant enlloc de cèl.lules infectades.

Figura 26. Matrigel in vivo. Immunofluorescència per m-CD31 que mostra les diferències en la vasculatura en les plaques de matrigel. Per un mateix ratolí, es mostra una imatge de la placa amb presència de p19 i a la dreta el matrigel amb el control.



DISCUSSIÓ

Queda clar que l'arteritis de cèl·lules gegants és una malaltia que malgrat té una bona opció terapèutica que indueix una milloria simptomàtica important, a dia d'avui, aquesta és insuficient, ja que no aconsegueix el control clínic d'alguns pacients, s'han establert complicacions com l'aneurisma d'aorta a llarg termini i a més presenta efectes secundaris sovint molt invalidants tenint en compte que els pacients són d'edat avançada i molts d'ells no poden arribar a abandonar els corticoides pel risc de rebrots.

És per aquest motiu que es busquen alternatives terapèutiques que puguin solventar les mancances de l'actualitat i és per això que cal investigar millor l'etiopatogènia d'aquesta malaltia amb la finalitat de trobar noves dianes terapèutiques.

Al llarg dels anys s'han anat sumant moltes evidències científiques de que la resposta inflamatòria que trobem en l'ACG és bàsicament una resposta immune tipus Th1. Una de les citocines estudiades en aquesta malaltia és el TNF α i diversos estudis, entre ells un del nostre grup (*Hernandez-Rodriguez 2004*) havien demostrat com l'augment de producció del TNF α s'associa amb alts requeriments terapèutics. Aquest fet, sumat a que el bloqueig d'aquesta citocina s'havia vist útil en el tractament de malalties inflamatòries com l'artritis reumatoide i granulomatoses com el Crohn, (*Kolden 2000, Feldmann 2001*) va motivar la generació d'un assaig clínic a nivell multicèntric per determinar l'eficàcia terapèutica i la seguretat del bloqueig del TNF α amb infliximab en pacients amb ACG. L'estudi no va mostrar evidència que l'infliximab fos útil com a tractament de manteniment (*Hoffman 2007*). És arrel d'aquest assaig

però, i d'un subestudi prospectiu longitudinal que s'en deriva, que es van analitzar els marcadors inflamatoris de 4 pacients detectant-se un comportament dissociat entre les dues subunitats de la IL-12. Mentre el mRNA de la IL-12p40 persistia elevat en pacients amb rebrots freqüents però indetectable en els que es trobaven en remissió, la IL-12p35 es trobava present en baixes concentracions en els pacients amb rebrots (*Visvanathan 2011*). Aquest fet a més a més concordava amb estudis realitzats amb models de malalties autoimmunitàries com la EAE, on ratolins amb dèficit de p40 no desenvolupen la malaltia o desenvolupen formes molt menys greus. Amb el descobriment de la IL-23 p19 (*Oppmann 2000*), es va veure que la IL-23 compartia la subunitat p40 amb la IL-12. En crear ratolins knock out per IL-23 p19 s'en van adonar, que eren aquests, i no els deficients per IL-12 p35, els que no desenvolupaven la malaltia. Demostrant que era la IL-23 i no la IL-12 la interleucina fonamental per desenvolupar la EAE (*Cua 2003*). Posteriorment a aquest fet, es va veure com la IL-23 expandia la producció de cèl.lules Th17 i que aquestes eren capaces d'induir la EAE en ratolins sense malaltia prèvia (*Langrish 2005*).

És per això que en l'estudi de Visvanathan et al vam pensar que la persistència de IL-12p40 podia està relacionada amb la IL-23 més que amb la IL-12 i per aquest motiu la IL-23p19 i la IL-17 van ser analitzades per real-time PCR trobant-les sobre-expressades pre-tractament i presentant una clara davallada post-tractament. Malgrat altres mRNA es van trobar elevats, cap altre gen clarament es diferenciava entre els pacients que rebrotaven i els que no. Com a limitació de l'estudi per treure conclusions més rellevants hi havia la inclusió de pocs casos .

Tot això ens va motivar a estudiar la presència d'aquestes citocines: IL-12p40, IL-12p35, IL-23p19 i IL-17 i la seva possible implicació en la resposta inflamatòria en l'arteritis de cèl.lules gegants.

1) Expressió de les interleucines IL-12 p40, IL-12 p35 i IL-23 p19 en l'ACG

Els resultats que presentem demostren una sobreexpressió de mRNA de les subunitats p40 i p19 en les lesions arterials dels pacients amb ACG de forma significativa, mentre que la p35 no presenta diferències respecte els controls. Fet que confirma en una sèrie àmplia de pacients la dissociació entre la p40 i la p35, l'augment de la p19 i que ens porta a suggerir que potser és la IL-23 més que la IL-12 qui pot tenir un rol proinflamatori en l'ACG.

També hem pogut demostrar l'expressió proteica d'aquestes citocines mitjançant la immunotinció del teixit arterial. A més hem pogut veure que la localització d'aquestes citocines coincideix amb l'àrea d'inflamació.

En el plasma no hem pogut confirmar aquests resultats ja que la IL-12 i la IL-23 estaven per sota el dintell de detecció de la tècnica i pel que fa a la p40, que hem pogut quantificar bastant al límit de detecció, no hem trobat diferències significatives respecte els controls. També és d'estranyar que detectem la subunitat p40 sense trobar IL-12 o IL-23, pel que una possibilitat fóra que amb aquesta tècnica hàgim detectat homodímers de p40, que com sabem també es poden formar (*Gillessen 1995*).

Un cop confirmada la presència d'aquestes citocines en l'ACG vam voler relacionar-les amb característiques fenotípiques dels malalts per tal de detectar un possible rol participatiu d'aquestes citocines en la inflamació o en d'altres aspectes de la malaltia. Així doncs vam analitzar la relació entre el nivell d'aquestes citocines i la presència de símptomes cranials, polimiàlgia reumàtica,

síntomes sistèmics i complicacions isquèmiques. No vam poder establir correlació amb cap dels paràmetres estudiats de forma significativa, destacant només la tendència a que la p19 fos més elevada en pacients amb una resposta sistèmica intensa.

Per estudiar la possible relació de la IL12 i la IL23 en la persistència i evolució de l'ACG, vam utilitzar dos paràmetres importants de seguiment dels pacients com són el número de rebrots i el requeriment terapèutic. Comparant pacients sense rebrots o només un, respecte els pacients amb més d'un rebrot no vam poder veure diferències significatives en els nivells d'aquestes interleucines entre els dos grups. Per analitzar els requeriments terapèutics vam utilitzar dos paràmetres com són el temps requerit per arribar a la dosi de manteniment de ≤ 10 mg/dia de prednisona i el temps requerit per retirar del tot la medicació. No vam poder establir tampoc diferències entre els pacients amb alts requeriments terapèutics o els que requereixen dosis baixes de corticoides i el nivells d'aquestes citocines, exceptuant la subunitat p40, de la que detectem uns nivells de mRNA locals inicials més elevats en els pacients que podran deixar abans el tractament amb prednisona.

En resum, amb els nostres resultats no podem concloure efectes sistèmics clars d'aquestes citocines en l'ACG, si bé les hem trobat augmentades a nivell local en les lesions inflamatòries, sobretot la IL-23 i per tan potser el seu efecte s'ha d'esperar a aquest nivell o bé com a part fonamental d'una possible resposta Th17 en aquesta malaltia.

La IL-23 és necessària per l'expansió i homeostasi de les cèl.lules Th17. S'ha vist com el bloqueig de la IL-23 pot suprimir el desenvolupament de diverses malalties autoimmnes en

models animals i en alguns casos com això és efecte de la conseqüent disminució de la IL-17, principal producte de les cèl.lules Th17. EL bloqueig d'aquesta citocina i/o de la IL-17 s'ha vist útil no només en models animals sino també en el control de malalties autoimmunes. És per això que es considera l'axis IL23/Th17 essencial en moltes malalties inflamatòries immunomediades i s'estan utilitzant com a noves dianes terapèutiques (*Iwakura 2006*). El bloqueig d'aquest eix s'ha vist útil en models animals de malalties desmialinitzants (EAE), artritis reumatoide (CIA) i malaltia inflamatòria intestinal i ja són una realitat els assaigs clínics amb tractament biològics que bloquegen la IL-23 o la IL-17. N'és un exemple l'ustekinumab, anticòs monoclonal anti p40 i que per tan actua inhibint la IL-12 i la IL-23. Tractament que s'ha demostrat útil respecte el placebo i que ja està aprovat com a tractament per la psoriasis i també ha demostrat eficàcia en l'artritis psoriàsica. Els resultats per la malaltia de Crohn són menys evidents i no s'ha mostrat efectiu per l'esclerosi múltiple. Secukinumab és un anticòs monoclonal contra IL-17A del que hi ha resultats prel.liminars en alguns assaigs en psoriasi i espondilitis anquilosant (*Tussinot 2012*).

Ja que a dia d'avui queda clar que aquesta via és una possibilitat real de dianes per nous tractaments en malalties inflamatòries, creiem important aprofundir en l'estudi d'aquestes citocines que amb els nostres resultats ja hem comprovat estan presents en l'ACG de forma significativa.

Coneixedors de que la IL-17 també s'havia mostrat elevada en l'estudi de Visvanathan et al i havent trobat aquesta sobreexpressió de p19 a nivell arterial vam voler ampliar l'estudi de la resposta Th17 en l'ACG.

2) Expressió de la interleucina IL-17 en l'ACG

En primer lloc vam corroborar una correlació positiva entre els nivells que havíem detectat de mRNA IL-23 p19 i els de mRNA IL-17 en les lesions arterials de l'ACG.

Simultàniament vam veure que de la mateixa manera que IL-23 p19 estava augmentada en aquesta malaltia, també ho estava la IL-17, detectant uns nivells de mRNA en les artèries patològiques significativament superior als controls, fet que també vam comprovar a nivell proteic amb l'ajuda de la immunohistoquímica. Hem vist que la IL-17 es troba expressada en les artèries dels pacients sobretot en les àrees d'inflamació, tal com succeïa amb la resta de citocines estudiades i tenim evidència de la seva desaparició en segones biòpsies realitzades un any després del diagnòstic.

Pel que fa a la relació amb les característiques fenotípiques dels malalts, amb els paràmetres estudiats que han estat els abans esmentats per les altres citocines, tampoc la IL-17 sembla determinant. En canvi quan vam estudiar la seva relació amb la persistència i evolució de la malaltia mitjançant l'anàlisi de rebrots i requeriment terapèutic, destaca un resultat sorprenent i una mica a la inversa del que potser era esperat ja que de forma significativa els pacients amb nivells més elevats d'IL-17 requereixen menys tractament, de manera que arriben abans a la dosi de manteniment i poden retirar els corticoides de forma més precoç. També tenen la tendència a presentar menys rebrots, tot i que no ha estat estadísticament significatiu. Aquests resultats que ja van ser presentats al Congrés Americà de Reumatologia (ACR) l'any 2008 (*Espígol-Frigolé*

2008) enllacen amb un article publicat durant la realització de la tesi on també s'estudia la resposta Th17 en l'ACG.

En aquest article bàsicament analitzen la presència d'IL-17 i d'altres interleucines relacionades amb les respostes Th1 i Th17, en l'artèria temporal i en el sèrum de pacients amb ACG abans i després del tractament amb glucocorticoids. Detecten que tan la IL-17 com les cèl.lules CD4 Th17 i la majoria d'interleucines estudiades com la IL-6, IL-1, IL-23, IFN γ i IL-12 es troben elevades abans del tractament detectant una supressió de tota la resposta Th17 després del tractament però no de la resposta Th1 que aparentment segueix activa amb nivells elevats d'IFN γ . Concloent que l'ACG presenta dues vies patogèniques, Th1 i Th17 i que l'efecte del tractament amb glucocorticoids és capaç d'inhibir la via Th17 però no la Th1 (*Deng 2010*).

Aquest resultat corrobora la nostra detecció de la IL-17 com a predictor de bona resposta terapèutica en aquests pacients. Buscant una explicació a aquest fet, si bé és cert que tal com s'ha dit, això pot ser degut a que la via és fàcilment regulable pels corticoides i nosaltres mateixos apuntàvem aquesta possibilitat en la comunicació a l'ACR, això no explicaria perquè altres patologies bàsicament mediades per aquest eix IL23/IL17 no tenen la mateixa resposta al tractament amb corticoides. Buscant altres hipòtesis cal pensar en la capacitat de les Tregs per actuar coma a tals, inhibint la resposta immunològica, quan són estimulades únicament pel TGF β o en determinades circumstàncies pro-inflamatòries i amb la presència de la IL-6 es poden transformar en cèl.lules Th17. Potser davant l'efecte immunomodulador i frenador dels corticoides aquestes cèl.lules abans Th17 es transformen en Tregs de nou essent una possible explicació de la davallada de la Th17 en aquest context. Un estudi en artritis reumatoide mostra com en sang perifèrica hi ha un increment significatiu de les cèl.lules Th17 respecte les Treg i

també un clar increment de les citocines relacionades amb la Th17 com IL-17, IL-23, IL-6 i TNF α , mentre que hi ha un descens significatiu del TGF β (Niu Q 2011).

3) Expressió i funció de la IL-23 a nivell endotelial

Després de comprovar com la IL-23 es troba augmentada en les lesions arterials de l'ACG, no hem pogut confirmar que tingui un paper rellevant en l'evolució de la malaltia amb els paràmetres que nosaltres hem evaluat. Tot i així, això no significa que per exemple, pugui tenir un rol destacat en la inflamació a nivell local. Tenint en compte la importància de l'endoteli en l'inici de tota resposta inflamatòria, sumat al fet de que la inflamació de l'ACG sembla tenir el seu origen en els petits vasos adventicials i coneixedors de que les cèl.lules endotelials són capaces de sobreexpressar RNA de p19 quan són estimulades amb TNF α , ens vam proposar l'estudi d'un camp inexplorat fins al moment: el possible rol de la IL-23 a nivell endotelial.

Expressió i secreció d'IL23 per les cèl.lules endotelials

En primer lloc vam comprovar la capacitat de les cèl.lules endotelials per produir IL-23 p19 després de ser activades per diversos factors inflamatoris, des de citocines com el TNF α o l'IFN γ presents en l'ACG, com també activadors dels TLRs, descrits en la patogènia de l'ACG en la seves etapes més inicials com a estimuladors de la maduració de les APCs. Amb aquests estímuls hem estat capaços d'evidenciar la producció de la subunitat p19, però no de l'heterodímer, ja que no hem detectat expressió de p40 a diferència del que succeeix amb els monòcits (PBMC), que després de l'estímul amb LPS produeixen ambdues subunitats, de fet proporcionalment més p40

que p19 tal i com també descriuen (*Wolf 1991*) considerant la p19, la subunitat restrictiva alhora de secretar la IL-23 activa biològicament.

Pel que fa a la seva secreció, és cert que en els sobrenedants dels cultius de les cèl.lules endotelials o gairebé no hem detectat IL-23 o bé, hem detectat la subunitat p19 per W-B en cèl.lules infectades amb el seu vector, requerint la precipitació de grans quantitats de sobrenedant. Fins ara el que se sap en quan a la secreció d'aquesta subunitat és el que apuntaven Oppmann et al. i és que requereix la subunitat p40 per ser alliberada.

També hem comprovat l'expressió del receptor de la IL-23. Tal i com està descrit per Parham et al hem detectat en els monòcits les dues cadenes que conformen el receptor i que aparentment són essencials per l'acció de la IL-23 (IL12R β 1 i IL23R), però en les cèl.lules endotelials, bàsicament la cadena IL23R no sembla expressar-se ni després de l'estímul per factors inflamatoris.

Funcions biològiques de la IL-23 p19 a nivell endotelial en un context inflamatori

Per estudiar si la IL-23 p19 derivada de la cèl.lula endotelial pot tenir alguna funció biològica, ens vam centrar bàsicament en tres aspectes importants del rol inflamatori de l'endoteli. D'una banda el reclutament de cèl.lules inflamatòries (atracció, adhesió, transmigració), de l'altre, la seva capacitat per expressar citocines i altres gens relacionats amb la inflamació i finalment amb l'angiogènesi, fenomen fonamental en el manteniment de la inflamació crònica (Pober 2007).

1) Reclutament de leucòcits:

Amb l'experiment funcional de l'adhesió de monòcits destaquem el fet de que els leucòcits presenten major adherència en la monocapa de cèl.lules endotelials EAHY amb sobreexpressió de p19 respecte el seu control de cèl.lules que expressen el lentivirus amb el vector buit. Tot i que aquest és un estudi molt preliminar i que caldria tornar a repetir amb les cèl.lules HUVEC intentant també delimitar quins subtipus de leucòcits estan implicats en aquesta adhesió, aquest és un punt de partida important ja que és el primer indicatiu de que la p19 derivada de les cèl.lules endotelials pot afavorir un dels aspectes pro-inflamatoris d'aquestes cèl.lules. Bàsicament aquesta és una observació totalment nova que ens porta a plantejar-nos moltes preguntes, entre elles quin podria ser el mecanisme d'acció de la p19 en aquest cas.

2) Expressió de gens pro-inflamatoris:

En consonància amb l'estudi anterior, hem trobat mitjançant RT-PCR, que en les cèl.lules HUVEC amb sobreexpressió de p19 estimulades per TNF α es produeix un augment de les quimiocines CXCL9, CXCL10 i CXCL11. Les quimiocines són una família de molècules amb un paper molt destacat en el reclutament i activació dels leucòcits i concretament CXCL9, CXCL10 i CXCL11 són clarament estimulades per l'IFN γ en les respostes immunomediades per Th1 i comparteixen el receptor CXCR3, que és expressat bàsicament per cèl.lules T activades i cèl.lules NK (*Cid 2011*).

També en aquesta mateixa línia hem trobat que les cèl.lules HUVEC infectades amb el vector p19, en estat basal tenen un augment d'expressió de dues importants molècules d'adhesió: ICAM-1 i VCAM-1.

3) Angiogènesi:

In vitro, hem observat un lleuger augment, per part de les cèl.lules amb expressió del vector p19 respecte el seu control, de formar estructures similars a cordons vasculars, que bàsicament explora la capacitat de diferenciació cel.lular incloent adhesió a la matriu extracel.lular, la generació de gradients de quimiocines, polarització, formació de filopodies, migració cel.lular, i la unió cel.lula-cèl.lula. Si bé in vivo hem comprovat una possible diferència en la neovascularització amb la presència o no de p19, l'estudi és massa limitat en nombre per treure'n conclusions. L'efecte pro-angiogènic de la p19 en la literatura està descrit, però el seu mecanisme no queda clar i bàsicament s'ha atribuït a la inducció d'altres mol.lècules com la MMP9 o la IL-17 (Langowski 2006).

Tot i que són preliminars i requereixen confirmació, aquests resultats, sobretot l'augment de quimiocines i el de mol.lècules d'adhesió per part de les cèl.lules endotelials amb sobreexpressió de p19 recolzats per l'experiment d'adhesió de monòcits, ens obren una nova perspectiva pel que fa a l'activitat biològica de la p19 i ens obren també molts interrogants:

- Si la p19 derivada de l'endoteli té acció biològica, la té de forma independent de la p40?
- Sino és secretada, pot tenir un mecanisme d'acció intracel.lular?
- Recentment s'ha trobat que la p35, inicialment només descrita com a subunitat de la IL-12 es pot unir també a Ebi3 i formar la IL-35, podria la p19 unir-se a una altra subunitat que desconexem?

- No hem detectat el receptor per la IL-23 en les cèl.lules endotelials, però en podria existir un altre?

L'estudi realitzat l'any 2001 per Wiekowski et al, amb els ratolins transgènics per p19 que mostraven inflamació sistèmica amb evidència de vasculitis a nivell histològic, deixava també moltes qüestions per resoldre. D'una banda sabem per Oppmann et al. que la subunitat p19 de la IL-23 requereix la p40 per poder ser secretada i activa biològicament. No obstant, en l'estudi dels ratolins transgènics, només van sobreexpressar la subunitat p19 i a més no van detectar nivells augmentats de p40 en el sèrum d'aquests ratolins com era d'esperar. Tal com apuntaven els mateixos autors és probable que la p40 es trobés a nivell local i que s'hagués secretat de forma paracrina, però no tenim evidències d'aquest fet i en realitat no és l'únic exemple en la literatura d'una expressió dissociada evident entre les dues subunitats.

Se sap que la IL-23 és important en l'artritis reumatoide (AR) sobretot per la seva acció promotora de les cèl.lules Th17, tot i que la majoria d'estudis estan centrats en la IL-23 p19, no en la IL-23 com a tal. Brentano et al. l'any 2009 van comprovar com efectivament la subunitat p19 estava present de forma abundant en el líquid sinovial dels pacients, mentre que l'heterodímer el van detectar en nivells molt baixos. En experiments in vitro van comprovar com l'activació de TLRs que també s'han demostrat sobreexpressats en l'AR (*Ospelt et al 2008*), bàsicament conduïa a un augment d'expressió de la p19 per part dels RASF (RA sinovial fibroblasts), però no de la p40 (a diferència del que passava amb els monòcits que després de l'estimulació dels TLRs produïen la IL23 completa). Al final de l'estudi els autors també es qüestionaven el mateix. Pot la p19 tenir efectes biològics independentment de la p40?

Basant-nos en el nostre estudi, amb la sobreexpressió de la p19 detectem un efecte de la mateixa que podria ser intracel.lular. I no seria el primer cas descrit d'interleucina que actua a aquest nivell. La IL-1 alpha, pot actuar extracel.lularment via receptors de membrana, però també hi ha evidències de que alguns dels seus efectes depenen de la seva localització nuclear, on pot ser translocada. S'han descrit accions intracel.lulars on sembla involucrada, com ara la proliferació, apoptosi i migració, tot i que el mecanisme no queda del tot clar (*Buryskova 2007*). En aquesta proteïna intracel.lular també se li atribueix la capacitat d'induir la producció d'algunes citocines com ara la IL-8 o la IL-6 en determinades circumstàncies (*Cheng 2008, Palmer 2005*).

Per comprovar aquesta teoria en el nostre cas seria interessant aprofundir en les vies de transcripció intracel.lulars i estudiar si alguna d'elles es veu activada amb la sobreexpressió de la p19.

Una altra possibilitat, és que amb els factors estimuladors que hem utilitzat per produir p19, no hàgim pogut augmentar la producció de p40 i potser calen altres circumstàncies perquè això passi a nivell de la cèl.lula endotelial. O bé que la p40 sigui aportada per altres cèl.lules. Ampliar l'estudi amb co-cultius seria interessant per resoldre aquesta qüestió. També la co-infecció de p19 i p40 en les cèl.lules endotelials ens ajudaria a resoldre el dubte de la seva capacitat de secreció de la subunitat p19.

En definitiva, hem comprovat la capacitat de producció de la IL-23p19 per part de la cèl.lula endotelial i tenim indicis de que aquesta citocina derivada d'aquestes cèl.lules pot tenir una funció biològica, obrint així un territori ampli encara inexplorat per seguir estudiant.

CONCLUSIONS

1) Hem comprovat com les interleucines IL-12 i IL-23 es troben altament expressades en l'ACG tan en forma de mRNA com de proteïna a nivell local. No hem pogut establir la seva relació amb les característiques fenotípiques dels pacients i pel que fa a la persistència de la malaltia nivells elevats inicials en el mRNA de la subunitat p40, semblen relacionar-se amb una millor resposta al tractament.

2) Els nostres resultats demostren una correlació entre els nivells de mRNA d'IL-23 i els d'IL-17 en l'ACG i una important expressió d'IL-17 en aquesta malaltia. A més de comprovar la presència d'aquestes interleucines relacionades amb la resposta Th17, quan hem estudiat la seva relació amb l'evolució de l'ACG, contràriament al que podríem esperar, hem detectat la IL-17 com a factor predictor de bon pronòstic.

3) La naturalesa bàsicament observacional del nostre estudi impedeix establir conclusions respecte el mecanisme que justifica el rol de la IL-17 i de les cèl.lules Th17 en l'ACG. La interrelació entre les respostes Th1, Th17 i el possible paper de les Treg en aquesta patologia, requereix més investigació.

4) Amb els nostres resultats hem comprovat que diversos estímuls inflamatoris com el TNF α o l'IFN γ afavoreixen la producció d'IL-23p19 per part de les cèl.lules endotelials. També hem vist l'expressió d'aquesta subunitat en cèl.lules endotelials a nivell de l'artèria temporal. No

hem pogut detectar la co-producció de p40, en principi necessària per la secreció de la citocina amb activitat biològica (IL-23).

5) Els nostres estudis preliminars, orienten que la IL-23p19 derivada de les cèl.lules endotelials pot ser funcional, tot i que amb els nostres resultats encara no podem establir cap mecanisme que ho expliqui, s'obren així bastants interrogants en un camp fins ara inexplorat i que de ben segur mereix també més investigació.

BIBLIOGRAFIA

Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 71:1–8169

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003; 278:1910–1914

Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med.* 1995;182:155–162

Bacon CM, Peticoin EF, Ortaldo JR et al. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:7307–7311

Belladonna ML, Renauld JC, Bianchi R et al. IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 168:5448–5454

Bettelli E, Kuchroo VK. IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med.* 2005; 201:169–171

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006 ; 441:235–38

Blockmans D, Bley T, Schmidt . Imaging for large vessel vasculitis *Curr Opin Rheumatol* 2009;21:19-28

Bongartz T, Matteson EL. Large-vessel involvement in giant cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:10–7

Brentano F, Ospelt, Sanczyk J et al. Abundant expressió of the IL-23 subunit p19, but low levels of IL23 in the rheumatoid synovium: differenal expression and Toll-like receptor dependent regulation of the IL23 subunits, p19 and p40, in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:143-50

Bromley SK, Mempel TR, Luster AP. Orchestrating the orchestrators. Chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol.* 2008;9:970-80

Bruhl H, Vilhauer V, Weiss M, et al. Expression of DARC, CXCR3, and CCR5 in giant cell arteritis. *Rheumatology* 2005;44:309-13

Brunda MJ, Luistro L,Warrier RR, et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993;178:1223-30

Bruce E. Sands, MD, MS, Eric W. et al. Oral Interleukin-12/23 Inhibitor Apilimod Mesylate for Treatment of Active Crohn’s Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1209–1218

Buryskova M, Pospisek M, Grothey A et al. Intracellular Interleukin- α functionally interacts with histone acetyltransferase complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 4017-4026

Chen Y, Langrish CL, McKenzie B et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J.Clin.Invest* 2006, 116:1317-1326

Cheng W, Shivshankar P, Zhong Y, Chen D, Li Z, Zhong G. Intracellular interleukin-1 α mediates interleukin-8 production induced by *Chlamydia trachomatis* infection via a mechanism independent of type I interleukin-1 receptor. *Infect Immun* 2008;76:942-951

Cid MC, Ercilla G, Vilaseca J, Sanmarti R, Villalta J, Ingelmo M, Urbano-Marquez A. Polymyalgia Rheumatica: a syndrome associated with HLA-DR4 antigen. *Arthritis Rheum*. 1988 May;31(5):678-82

Cid MC, Font C, Coll-Vinent B, Grau JM. Large vessel vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:18-28

Cid MC, Font C, Oristrell J et al. Association between strong inflammatory response and low risk of developing visual loss and other cranial ischemic complications in GCA. *Arthritis and Rheum* 1998;41:26-32

Cid MC, Cebrián M, Font C, Coll-Vinent B, Hernández-Rodríguez J, Esparza J, Urbano-Márquez A, Grau JM. Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in

GCA: inflammation-induced angiogenesis as the preferential site of leukocyte-endothelial and interaction .*Arthritis Rheum.* 2000 Jan;43(1):184-94

Cid MC, Hernández-Rodríguez J, Esteban MJ. Tissue and serum angiogenesis activity is associate with low prevalence of ischemi complications in patients with GCA. *Circulation* 2002;106:1664-71

Cid MC, Hoffman MP, Hernández-Rodríguez J, Association between increased CCL2 (MCP-1) expression i lesions and persistence of disease activity in GCA. *Rheumatology* 2006;45:1356-63

Cid MC, García-Martínez A, Lozano E, Espígol-Frigolé G, Hernández-Rodríguez J. Five clinical conundrum in the manegement of GCA. *Rheum Dis Clin North Am.* 2007 Nov;33(4):819-34

Cid MC Clinical consequences of inefficient vascular remodeling. *APMIS Suppl.* 2009 Jun;(127):10-20

Cid MC, Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Espígol-Frigolé G, García-Martínez A, Hernández-Rodríguez J, Segarra M. Cytokines and vascular inflammation. *Inflammatory diseases of blood vessels.* Eds. C.Weyand, G Hoffman,G Langford , J Goronzy. (2a edicio) 2011 (in press)

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007; 450:566–569

Constantinescu CS, Wysocka M, Hilliard B et al. Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1998; 161:5097–5104

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-86

Cua D.J, Sherlock J, Chen Y et al. IL-23 rather than IL-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421, 744-748

Dasgupta B et al. Development of Classification Criteria for Polymyalgia Rheumatica (PMR): Results from an International, Prospective, Multi-Center Longitudinal Study ACR – EULAR Study Group for Development of Classification Criteria for PMR. *Ann Rheum Dis* 2011 (in press)

Del Vichio M , Bajetta E, Canovas S, et al. IL-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007; 13:4677-85

Deng J, Younge BR, Oshen RA et al. Th17 and Th1 T cell-responses in GCA. *Circulation.* 2010;121:906-915

Devergne O, et al. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol.* 1996; 70:1143–11536

Espígol-Frigolé G, Lozano E, García-Martínez A, Segarra M, Corbera M, Hernández-Rodríguez J, Grau JM, Cid MC . Il-17 Expression In Temporal Arterial Lesions From Patients With Giant-cell Arteritis (GCA). *Arthritis Rheum* 2008;58 (suppl)

Evans JM , O'Flenn WM, Hunder GG. Increased incidence of aortic aneurysm and dissection GCA. A population based study. *Ann Intern Med* 1995;122;502-7

Evans JM, Bowles CA, Bjornsson J et al. Thoracic aortic aneurysm and rupture in GCA. A descriptive study of 41 cases. *Arthritis Rheum* 1994;37:1539-47

Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF α therapy of Rheumatoid arthritis: what have we learned?. *Annu Rev Immunol* 2001;19:163-96

Foell D, Hernández-Rodríguez, Sánchez M, et al. Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of GCA. *J Pathol* 2004;204:311-6

Foroozan R, Deramo VA, Bunono LM et.al. Recovery of visual function in patients with biopsy-proven GCA. *Ophthalmology* 2003;110:539-42

Fuss IJ, Becker C, Yang Z. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:9–15

García-Martínez A, Hernández-Rodríguez J, Arguis P et al. Development of aortic aneurysm/dilatation during the followup of patients with GCA: a cross-sectional screening of fifty-four prospectively followed patients. *Arthritis and Rheumatism*, 2008;59 (3):422-430

García-Martínez A, Hernández-Rodríguez J, Espígol-Frigolé G, Prieto-González S, Butjosa M, Segarra M, Lozano E, Cid MC. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010 Jun;62(6):835-41

Gately MK, et al. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J Immunol*. 1991; 147:874–882

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the Tlymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:6115–6119

Gillessen S, Carvajal D, Ling P et al. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol*. 1995; 25:200–206

Gonzalez-Gay MA, Garcia Porrua, Piñeiro A et al. Aortic aneurysm and dissection in patient with biopsy-proven GCA from northwestern Spain: a population-based study. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:335-41

Gonzalez-Gay MA, Barros S, Lopez-Diaz MJ, Garcia-Porrua C, Sanchez-Andrade A, Llorca J. Giant cell arteritis: disease patterns of clinical presentation in a series of 240 patients. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:269–76

González-Gay MA, Martínez-uboís C, Agudo M, Pompei O, Blanco R, Llorca J. GCA: epidemiology, diagnosis and management. *Curr Rheumatol Rep* 2010;12:436-42

Gubler U, et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:4143–4147

Hayreh SS, Zimmerman B. Visual deterioration in giant cell arteritis patients while on high doses of glucocorticoid therapy. *Ophthalmology* 2003;110:1204–15

Hazlett J, Stamp LK, Merriman T, Highton J and Hessian PA. IL23R rs11209026 polymorphism modulates IL-17A expression in patients with RA. *Genes Immune* 2011

Helweg-Larsen J, Tarp B, Obel N. No evidence of parvovirus B19, chlamydia pneumoniae or human herpes virus infection in temporal artery biopsies in patients with GCA. *Rheumatology* 2002;41:445-9

Hernandez-Rodriguez, Garcia-Martinez A, Casademont J. A strong initial systemic inflammatory response is associated with higher corticosteroid requirements and longer duration of therapy in patients with GCA. *Arthritis Rheum* 2002;47:29-35

Hernández-Rodríguez J, Segarra M, Vilardell C, Sánchez M, García-Martínez A, Esteban MJ, Grau JM, Urbano-Márquez A, Colomer D, Kleinman HK, Cid MC. *Circulation*. 2003 May 20;107(19):2428-34.

Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C et al., Elevated production of interleukin-6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant-cell arteritis: angiogenic activity of interleukin-6 as a potential protective mechanism. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Mar;43(3):294-301

Hernandez-Rodriguez, Hoffman GS, Merkel PA et al. Anti-tumor necrosis factor therapy in patients with difficult to treat Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2296-304

Hernández-Rodríguez, Garcia-Martinez A, Espígol-Frigolé G. et al. Sustained spontaneous clinical remission in giant cell arteritis: report of two cases with long-term followup. *Arthritis Rheum*, 2006: 55:160-162

Hernández-Rodríguez J, Cid MC, López-Soto A, Espígol-Frigolé G, Bosch X. Systematic Review: Treatment Of Polymyalgia Rheumatica *Arch Intern Med*: 2009;169:1839-1850

Hoffman GS, Cid MC, Hellmann DB et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of adjuvant methotrexate treatment for giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1309–18

Hoffman GS, Cid MC, Rend-Zagar KE et al. Infliximab for maintenance of glucocorticosteroid-induced remission of giant cell arteritis: a randomized trial *Ann Intern Med* 2007;146:621-30

Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol*. 2001; 166:5448–5455

Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol*. 2010;184:3336–40

Hunder GG. The early history of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: first descriptions to 1970. *Mayo Clin Proc* 2006;81(8):1071-83

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, et al. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121–3310

Iwakura Y, Ishigama H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006;116:1218-22

Jover JA, Hernandez-Garcia C, Morado IC, et al. Combined treatment of giant cell arteritis with methotrexate and prednisone. *Ann Intern Med* 2001;134:106–14

Kaiser M, Younge B, Björnson J, et al. Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenesis cytokines by multinucleated giant cells. *Am J Pathol* 1999;155:765-74

Kaiser M, Younge B, Björnson J. Platelet-derived growth factor, intimal hyperplasia, and ischemic complications in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:623–33

Kobayashi M, 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; 170:827–845

Krajina T, Leithauser F, Moller P, Trobonjaca Z, Reimann J. Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur J Immunol.* 2003; 33:1073–1083

Kolden JR, Smolen JS, Weisman M, Emery P, Feldmann M, Harriman GR, Maini RN: Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* 2000, 343:1595-602

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchrov K. IL-17 and Th17 cells. *Annu.Rev.Immunol* 2009; 27: 485-517

Krausz S, Boumans MJ, Gerlag DM, Lufkin J, van Kuijk AW, Bakker A, de Boer M, Lodde BM, Reedquist KA, Jacobson EW, O'Meara M, Tak PP. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Apremilast Mesylate, an IL-12/IL-23 Inhibitor, in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2011

Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, et al. 2007. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J. Immunol.* 179:5462–731

Kurzeja M, Rudnicka L, Olszewska M. New interleukin-23 pathway inhibitors in dermatology: ustekinumab, briakinumab, and secukinumab. *Am J Clin Dermatol.* 2011 Apr 1;12(2):113-25

Lee MS, Smith SD, Galor A, et al. Antiplatelet and anticoagulant therapy in patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3306–9

Lee E, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med.* 2004; 199:125–130

Lie JT. Aortic and Extracranial Large Vessel GCA: a review of 72 cases with histopathologic documentation. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24:422-431

Lighvani AA, et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:15137–15142

Liu GT, Glaser JS, Schatz NJ, et al. Visual morbidity in giant cell arteritis: clinical characteristics and prognosis for vision. *Ophthalmology* 1994;101:1779–85

Lozano E, Segarra M, García-Martínez et al. Imatinib mesylate inhibits in vitro and ex vivo biological responses related to vascular occlusion in GCA. *Ann. Rheum Dis* 2008

Lozano E, Segarra M, García-Martínez A, Espígol-Frigolé G, Hernández-Rodríguez J, Cid MC. New Therapeutic Targets In Giant-Cell Arteritis. Considerations based on the current pathogenic model and the availability of new therapeutic agents. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26 (3 Suppl 49)

Ma X, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med*. 1996; 183:147–15

Ma X, Trinchieri G. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv Immunol*. 2001; 79:55–92 141-50

Maksimowicz-McKinnon K, Hoffman GS. Large vessel vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25 (Suppl 44):S58–9. 2

Ma-Krupa, Jeon MS, Spoerl S, Tedder TF, Goronzy JJ, Weyand CM. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J Exp Med* 2004;199:173-83

Mahr A, Jover JA, Spiera RF, et al. Adjunctive methotrexate for treatment of giant cell arteritis: an individual patient data meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2789–9

Mangan PR, Harrington LE, O’Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, et al. 2006. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441:231–34

Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2004;351:2069–2079

McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, et al. 2007. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat.Immunol.* 8:1390–97

Metawi SA, Abbas D, Kamal MM, Ibrahim MK. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. *Clin Rheumatol.* 2011 Sep;30(9):1201-7

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:155–74

Mosmann TR, Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145–73

Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003; 198(12):1951-7

Nakahira M, et al. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression:IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. *J Immunol.* 2002; 168:1146–115311-23-24

Narazaki M, Tosato G. Tumor cell populations differ in angiogenic activity: a model system for spontaneous angiogenic switch can tell us why. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98:294-5

Nesher G, Berkun Y, Mates M, et al. Low-dose aspirin and prevention of cranial ischemic complications in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1332-7

Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med.*2007;13:26-28

Niu Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY, Wag LL. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2011

Nordborg E, Giant cell arteritis: epidemiological clues to its pathogenesis and an update on its treatment. *Rheumatology* 2003;42:413-421

Noordenbos T, Yeremenko N, Gofita I, Van de Sande M, Tak PP, Cañete JD, et al. IL-17 positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:99-109

Nueninghoff DM, Hunder DG et al Mortality of large-artery complication (aortic aneurysm, aortic dissection, and/or large-artery stenosis) in patients with giant cell arteritis: a population-based study over 50 years. *Arthritis and Rheum* 2003;48:3532-3527

Numasaki, M., J. Fukushi, M. Ono, S. K. Narula, P. J. Zavodny, T. Kudo, P. D. Robbins, H. Tahara, and M. T. Lotze. 2003. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101: 2620-2627

Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, et al. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448:480–83

O'Brien R.L, Roark CL, Born WK . IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Eur.J.Immunol.* 2009. 39:662-666

Oppmann B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000; 13:715–725

O'Shea JJ, Paul WE. Regulation of T(H)1 differentiation--controlling the controllers. *Nat Immunol.*2002; 3:506–508

Ospelt C, Brentano F, Rengel Y et al Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3684-92

Ostberg G. Morphological changes in the large arteries in polymyalgia arteritica. *Acta Med Scand Suppl* 1972;533:133-59

Palmer G, Trollet S, Talabot-Ayer D, Mezin F, Magne D, Gabay C. Pre-interleukin-1alpha expression reduces cell growth and increases interleukin-6 production in SaOS-2 osteosarcoma cells: Differential inhibitory effect of interleukin-1 receptor antagonist (icIL-1Ra1). *Cytokine* 2005;31:153–160

Parham C, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol.* 2002; 168:5699–5708

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, et al. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6:1133–41

Peluso I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World J Gastroenterol.* 2006;12:5606–5610

Peterson GL 1983. *Methods in enzymology* 91:95-119

Pflanz S, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity.* 2002; 16:779–790

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:803-15

Presky DH, et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:14002–1400

Prieto-González S, Arguis P, Garcia-Martinez, Espígol-Frigolé G, Tavera-Bahillo I, Butjosa M, Sánchez M, Hernández-Rodríguez J, Grau JM, Cid MC. Large vessel involvement in biopsy

proven giant cell arteritis: prospective study in 40 newly diagnosed patients using CT angiography, *Ann Rheum Dis* 2012

Proven A, Gabriel S, Orces C, et al. Glucocorticoid therapy in giant cell arteritis: duration and adverse outcomes. *Arthritis Rheum* 2003;49:703–8

Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, et al. Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium-large arteries. *Circulation* 2008, 16;118(12):1276-84

Rouvier, E et al 1993. CTLA-8 cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol* 150:5445-5456

Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *N Engl J Med* 2002;347:261-71

Salvarani C, Crowson CS, O'Fallon WM, Hunder GG, Gabriel SE. Reappraisal of the epidemiology of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota, over a fifty-year period. *Arthritis and Rheum* 2004; 51:264-8

Salvucci, O., L. Yao, S. Villalba, A. Sajewicz, S. Pittaluga, and G. Tosato. 2002. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood* 99:2703–2711

Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RM. A randomized trial of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2008;135:1130–1141

Segarra M, Garcia-Martinez A, Sanchez M et al Gelatinase expression and proteolytic activity in GCA. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1429-35

Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. 1998. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 273:27467–73

Solans-Laque R, Bosch-Gil JA, Molina-Catenario CA, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, Vilardell-Tarres M. Stroke and multi-infarct dementia as presenting symptoms of giant cell arteritis: report of 7 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2008;87:335–44

Spiera RF, Mitnick HJ, Kupersmith M, et al. A prospective, double-blind, randomized, placebo controlled trial of methotrexate in the treatment of giant cell arteritis (GCA). *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:495–501

Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med.* 1997; 185:817–824

Szekanecz Z, Koch AE. Mechanism of disease: angiogenesis in inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007;3(11):635-43

Takenaka H, et al. Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. *J Leukoc Biol.* 1997; 61:80–87

Trinchieri G, Pflanz Z, Kastelein RA et al The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003

Tussinot E. The IL-23/Th17 pathway as a therapeutic target in cronic inflammatory disease. *Allergy Drug Targets* 2012

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. 2006. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179–89

Visvanathan *Arthritis Rheum* 2008;58: S613

Visvanathan S, Tissue and serum markers of inflammation during the follow-up of patients with giant-cell arteritis--a prospective longitudinal study. *Rheumatology* 2011;50:2061-2070

Voest EE, Kenyon BM, O'ReillyMS,Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:581-6

Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock *Nat Med* 2007;13:1042-9

Wada Y, Lu R Zhou D, Chu,J, Przewloka T, Zhang S et al. Selective abrogation of Th1 response by STA-5326, a potent IL-12/IL-23 inhibitor. *Blood* 2007; 109(3):1156-64

Weyand CM, Hunder NN, Hicok KC, Hunder GG,Goronzy JJ. HLA-DRB1 alleles in polymyalgia rheumatica,giant cell arteritis, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:514–20

Weyand CM, Schönberger J, Oppitz U, et al. Distinct vascular lesions in giant cell arteritis share identical T cell clonotypes. *J Exp Med* 1994;179:951-60

Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG. Tissue cytokine patterns in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Intern Med* 1994;121:484-91

Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, et al. Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runtng, infertility, and premature death. *J Immunol* 2001, 166:7563-7570

Wilke WS, Hoffman GS. Treatment of corticosteroid resistant giant cell arteritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995;21:59–71

Wolf SF, et al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol*. 1991; 146:3074–3081.11

Wu C, Wang X, Gadina M, O'Shea JJ, Presky DH, Magram J. IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J Immunol.* 2000; 165:6221–6228

Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, et al. 2008. The helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 28:29–39

Yao, Z et al. 1995 Human IL17: a novel cytokin derived from T cells. *J. Immunol* 155:5483-5486.
Shi, Y et al. 2000 A novel cytokine receptro-ligand pail: identification, molecular characterization, an in vivo immunomodulatory activity. *J. Biol. Chem.* 275:19167-19176

Yao L, Salvucci O, Cardones AR et al. Selective expression of stromal-derived factor-1 in the capillary vascular endothelium plays a role in Kaposi sarcoma pathogenesis *Blood* 2003; 102:3900-3905

