FABRÍCIO DE SOUZA NEVES

**Expressão de receptores toll-like 2 e função quimiotática de
neutrófilos na doença de Behçet**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Processos inflamatórios e alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. Célio Roberto Gonçalves

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Neves, Fabrício de Souza

Expressão de receptores toll-like 2 e função quimiotática de neutrófilos na doença de Behçet / Fabrício de Souza Neves.-- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Suzana Beatriz Veríssimo de Mello.

Co-orientador: Célio Roberto Gonçalves.

Descritores: 1.Síndrome de Behçet/fisiopatologia 2.Receptor 2 Toll-like
3.Receptor 4 Toll-like 4.Antígenos CD14 5.Quimiotaxia 6.Neutrófilos 7.Monócitos

USP/FM/SBD-054/09

Agradecimentos

Aos orientadores, Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello e Dr. Célio Roberto Gonçalves, que doaram o melhor de suas experiências, no laboratório e na clínica, para a execução deste trabalho;

à Dra. Cláudia Goldenstein Schainberg, por sua inestimável colaboração no Laboratório de Imunologia Celular, onde os experimentos envolvendo a citometria de fluxo foram realizados;

a Maria Aurora Gomes da Silva, Maria de Fátima de Almeida e Solange Carrasco, com quem muito foi aprendido ao longo de muitas horas de bancada compartilhadas;

à Dra. Laís Verderame Lage, pela atuação junto ao ambulatório de doença de Behçet durante a realização deste estudo;

a Rogério Ruscitto do Prado, pela orientação estatística;

a Janet Fu McDevitt, Renate Schinke e Enelise Arnold, pelas revisões em Português e Inglês;

aos muitos colegas que, através de discussões construtivas, foram importantes desde a elaboração das idéias originais da tese – particularmente ao Dr. Roger Chammas, da Disciplina de Oncologia;

e à Disciplina de Reumatologia, através da Profa. Dra. Eloisa Bonfá, pelo ambiente propício ao trabalho e pesquisa.

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2007/52448-4)

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de siglas

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	12
3. Métodos.....	13
3.1. Pacientes e controles.....	13
3.2. Medida das expressões dos receptores TLR2, TLR4, CD14, CD114 e CD116 ligados à membrana de monócitos e neutrófilos circulantes.....	15
3.3. Isolamento de PMNs do sangue periférico.....	17
3.4. Avaliação da quimiotaxia de PMNs.....	17
3.5. Influência do LTA e do plasma de DB sobre a quimiotaxia de PMNs.....	18
3.6. Medida da concentração sérica de CD14s e de IL-6.....	19
3.7. Análise estatística.....	20
4. Resultados.....	21
4.1. Expressões dos receptores TLR2, TLR4, CD14, CD114 e CD116 ligados à membrana de monócitos e neutrófilos circulantes.....	21
4.2. Influência do LTA sobre a função quimiotóxica dos PMNs.....	23

4.3.	Influência de fatores plasmáticos sobre a função quimiotática dos PMNs.....	24
4.4.	Concentração sérica de CD14 solúvel.....	26
5.	Discussão.....	27
6.	Conclusões.....	34
7.	Anexos.....	35
7.1.	Anexo A.....	36
7.2.	Anexo B.....	38
7.3.	Anexo C.....	41
7.4.	Anexo D.....	66
7.5.	Anexo E.....	81
8.	Referências.....	93

Lista de siglas

BDCAF	Behçet's Disease Current Activity Form (Formulário de atividade atual da Doença de Behçet)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupamento de diferenciação)
DB	Doença de Behçet
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoabsorvente relacionado a enzima)
EUA	Estados Unidos da América
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FMLP	n-formil-metionina-leucil-fenilalanina
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i> (Fator estimulante de colônias de granulócitos)
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i> (Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> (Proteína de choque térmico)
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	<i>Lipoteichoic acid</i> (Ácido lipoteicoico)
LT	Linfócito T
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTh	Linfócito T <i>helper</i>

MICA	<i>MHC Class I related gene A</i> (gene A relacionado ao MHC classe I)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de histocompatibilidade principal)
PMN	Polimorfonuclear
PE	<i>Phycoerithrin</i> (Ficoeritrina)
PerCP	<i>Peridinin-Chlorophyll-Protein complex</i> (Complexo Peridinina-clorofila-proteína)
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> (Receptor toll-like)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de necrose tumoral)

Resumo

Neves FS. *Expressão de receptores toll-like 2 e função quimiotática de neutrófilos na doença de Behçet* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

A doença de Behçet tem sua fisiopatologia caracterizada por hiperatividade neutrofílica, particularmente em relação à quimiotaxia, e períodos de atividade da doença podem ser desencadeados por exposição a estreptococos. Uma vez que células do sistema imune inato são ativadas pelo ácido lipoteicoico (LTA) de bactérias gram-positivas via receptor toll-like (TLR) 2 e CD14, cujas expressões são reguladas pelos fatores estimulantes de colônias de granulócitos (G-CSF) e granulócitos-macrófagos (GM-CSF), o objetivo principal deste estudo foi determinar se há hiperexpressão de TLR2 em neutrófilos de DB ativa e se a quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN) neutrófilos na DB poderia ser hiperestimulada pelo LTA. Além do TLR2, foram medidas as expressões de TLR4, CD14, CD114 (receptor de G-CSF) e CD116 (receptor de GM-CSF) nos neutrófilos e nos monócitos de pacientes com doença de Behçet (DB), as concentrações séricas de CD14 solúvel (CD14s) e as respostas quimiotáticas dos PMNs de DB sob diferentes estímulos. A expressão dos receptores foi medida pela citometria de fluxo, as concentrações séricas por ELISA e as respostas quimiotáticas foram avaliadas em câmara de Boyden. Nos PMNs, os receptores foram igualmente expressos nos dois grupos e, estimulados com LTA, suas

respostas quimiotáticas também foram similares. Somente à incubação com plasma os PMNs de DB desenvolveram hiperquimiotaxia em relação aos PMNs controles. A expressão do TLR2 foi maior em monócitos de DB em relação aos controles, e a concentração de CD14s sérica, de origem monocitária, foi maior nos pacientes com DB ativa. Em conjunto, os resultados demonstram que PMNs de DB, isoladamente, não reagem exacerbadamente ao LTA, e suas respostas migratórias são estritamente dependentes de fatores estimulantes solúveis.

Descritores: Síndrome de Behçet/fisiopatologia, Receptor 2 Toll-like, Receptor 4 Toll-like, Antígenos CD14, Quimiotaxia, Neutrófilos, Monócitos

Summary

Neves FS. *Expression of toll-like receptor 2 and neutrophil chemotaxis in Behçet's disease* [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2009.

Expressions of toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, CD14, CD114 and CD116 were assessed on polymorphonuclear (PMN) neutrophils and monocytes of patients with Behçet's disease (BD). PMN chemotactic responses under different stimulations were also measured. The objective was to determine if BD PMN chemotaxis may be overstimulated by lipoteichoic acid (LTA) from gram-positive bacteria. Receptor expressions were measured by flow cytometry and PMN chemotaxis was assessed in a Boyden chamber. Only TLR2 expression was higher on monocytes of the BD group than in control group. On PMNs, however, TLR2 expression was similar in both groups and, when stimulated with LTA, BD PMN cells showed chemotactic responses similar to the controls. These cells only exhibited increased chemotaxis when incubated with plasma. In conclusion, isolated BD PMN did not overreact to LTA, and its hyperchemotaxis is strictly dependent on soluble stimulating factors.

Descriptors: Behçet syndrome/physiopathology, Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, Antigens CD14, Chemotaxis, Neutrophils, Monocytes

1. Introdução

A doença de Behçet (DB) é uma afecção inflamatória de etiologia desconhecida que se caracteriza clinicamente por úlceras orais e genitais, lesões cutâneas, uveíte e artrite, além de múltiplas outras manifestações menos frequentes (Yurdakul et al., 2004). Embora a maior parte de suas manifestações possa ser considerada relativamente benigna e autolimitada, ataques repetidos de inflamação ocular podem levar à cegueira, principal morbidade sequelar da doença. Adicionalmente, o acometimento de grandes vasos ou do sistema nervoso central pode ser agudamente grave ou progressivo, com importante letalidade (Sakane et al., 1999). O curso típico da doença consiste em surtos recorrentes de atividade inflamatória intercalados por períodos de remissão. Isto sugere que as exacerbações da doença podem ser causadas pela exposição de um indivíduo – com determinada predisposição a respostas inflamatórias exacerbadas – a fatores ambientais desencadeantes (Direskeneli, 2006).

Rara em boa parte do mundo, a DB concentra-se em distribuição geográfica peculiar, coincidindo com a “Rota da Seda” – antiga rota comercial ligando a Itália ao extremo Oriente. A Turquia apresenta as maiores prevalências, alcançando 370 casos por 100.000 habitantes (Zouboulis, 1999) e foi a origem dos casos descritos em 1937 pelo dermatologista turco Hulusi Behçet, que reconheceu como uma doença única os casos de úlceras genitais e orais recorrentes que se lhe

apresentavam, associados a outras manifestações sistêmicas. Trabalhando simultaneamente e de forma independente, o oftalmologista grego Benediktos Adamantiades também descreveu como uma nova doença uma série de casos de uveítes associadas a úlceras orais e genitais. A denominação Doença de Behçet costuma ser mais empregada internacionalmente, provavelmente porque os trabalhos do autor turco foram traduzidos para a língua inglesa e reproduzidos nos Estados Unidos da América (EUA), já na década de 1940, por alunos do Dr. Behçet que emigraram da Turquia durante a Segunda Guerra Mundial. A denominação “Doença de Adamantiades-Behçet” é algumas vezes empregada para homenagear ambos os autores (Zouboulis e Keitel, 2002). A doença, no entanto, é provavelmente milenar, sendo encontrados relatos compatíveis com suas manifestações clínicas nos textos de Hipócrates, do século V a.C.: “muitos tinham a boca afetada por ulcerações aftosas (...) também muitas lesões nas suas partes genitais (...) oftalmias lacrimosas de caráter crônico (...) que destruíram a vista de muitas pessoas” (Hipócrates, em sua obra Epidemio, livro III, apud Cheng, 2001).

Atualmente considerada um modelo singular de vasculite, sua etiopatologia não é totalmente conhecida. Lesões vasculares causadas por infiltrações de neutrófilos hiperativos, aparentemente coordenados por respostas autoimunes específicas, constituem as principais características atualmente reconhecidas na fisiopatologia da DB (Erlich, 1997). Hiperfunção de polimorfonucleares (PMNs) neutrófilos tem sido associada à DB desde a década de 1970, quando a quimiotaxia exacerbada destas células foi

descrita e a colchicina sugerida como terapia eficaz para a doença, devido a sua capacidade de inibição da motilidade dos PMNs. Essas observações foram originalmente feitas por pesquisadores japoneses, outro país de elevada prevalência da DB (Matsumara e Mizushima, 1975). A eficácia da colchicina no tratamento da DB foi de fato demonstrada 26 anos depois, num ensaio clínico controlado e duplo-cego com 116 casos, que evidenciou redução na frequência de episódios de artrites em homens e de artrites, úlceras genitais e eritema nodoso em mulheres com DB (Yurdakul et al., 2001).

Há mais de 30 anos, portanto, a hipótese da ocorrência de um estado hiperfuncional recidivante dos PMNs na DB tem sido empregada para explicar suas características clínicas e patológicas, inclusive para o fenômeno da patergia, peculiar a esta doença. Na patergia ocorre a formação de uma lesão cutânea eritematosa, com infiltrado celular rico em neutrófilos, 24 a 48 horas após trauma cutâneo leve – a introdução de uma agulha estéril no subcutâneo serve como teste padrão e representa um dos critérios diagnósticos da DB (Sakane et al., 1999). O motivo do surgimento desta reação cutânea inespecífica seria a capacidade do paciente com DB em desencadear rápida e intensa resposta inflamatória, de natureza inata, possivelmente baseada na hiper-reatividade de neutrófilos a estímulos mínimos.

Em 1977, Sobel et al. demonstraram que leucócitos isolados do sangue periférico de pacientes com DB tinham quimiotaxia superior a leucócitos controles quando estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) na

presença de soro de controles normais, mas, além disso, leucócitos de controles saudáveis também tinham quimiotaxia exacerbada quando estimulados com LPS na presença de soro proveniente de pacientes com DB. Os autores concluíram que um fator presente no soro de pacientes com DB é capaz de provocar hiper-reatividade em leucócitos normais, mas que também é possível que fatores intrínsecos aos leucócitos de DB, independentemente de seu microambiente, possam permitir sua hiper-reatividade a estímulos. Embora outras funções neutrofílicas exacerbadas também tenham sido descritas na DB, a hiperquimiotaxia de PMN é o achado mais consistentemente relacionado à fisiopatologia da doença, tendo sido observada *in vivo* e diretamente associada à atividade clínica da DB (Carletto et al., 1997). Takeno et al. (1995) e Carletto et al. (1997) discordaram quanto à origem do estado de hiper-reatividade neutrofílica: para Takeno et al., neutrófilos isolados de pacientes com DB eram hiper-reativos *per se*, e tal condição de hiper-reatividade intrínseca às células seria determinada geneticamente, estando associada ao marcador HLA-B51 (HLA, *Human Leukocyte Antigen*, Antígeno Leucocitário Humano). Carletto et al., ao contrário, observaram hiperfunção neutrofílica *in vivo*, mas não conseguiram reproduzir estes resultados *in vitro*, e destacaram a importância do microambiente pró-inflamatório do indivíduo doente na gênese da hiper-reatividade neutrofílica. De fato, ainda permanecem controvérsias, pois outros autores também não reproduziram a hiperquimiotaxia de PMNs de DB. Essa discrepância, provavelmente, ocorre em função de diferenças nas

técnicas laboratoriais empregadas ou na população estudada (Tüzün et al., 1999).

A associação da DB com o alelo HLA-B51 do MHC classe I (MHC, *Major Histocompatibility Complex*, Complexo Principal de Histocompatibilidade) foi feita inicialmente por Ohno et al. em 1982. Como a função básica da molécula do MHC classe I é apresentar peptídeos a linfócitos T (LT) CD8+, a participação de mecanismos de imunidade específica passou a ser pesquisada na DB. Produtos de outros genes próximos ao HLA, que poderiam ser transmitidos em desequilíbrio de ligação, passaram a ser investigados como candidatos ao peptídeo autólogo capaz de desencadear uma resposta autoimune associada ao HLA-B51. Nesse campo de pesquisa, destaque foi obtido pelo gene A relacionado ao MHC classe I (MICA, *MHC Class I related gene A*): a DB foi associada a frequências elevadas do alelo MICA*009 (Wallace et al., 1999). Os genes do grupo MICA são transcritos em resposta a situações de estresse (hipertermia, anóxia ou metabólitos tóxicos), gerando produtos do tipo “proteínas de choque térmico” (HSP, *Heat Shock Proteins*). Yasuoka et al., em 2004, de fato demonstraram a presença de respostas específicas de LT CD8+ a um peptídeo de nove aminoácidos da sequência codificada pelo alelo MICA*009 em quatro de 14 pacientes com DB e HLA-B51+. Um perfil de citocinas predominantemente LTh1 (linfócito T *helper* 1), caracterizado por níveis elevados de IL-12 (interleucina-12) e IFN γ (interferon- γ), também é descrito em lesões mucocutâneas da DB, sugerindo a presença de resposta imune específica celular nestes locais (Ben-Ahmed et al., 2004).

Adicionalmente, Niwa e Mizushima já haviam demonstrado, em 1990, que sobrenadantes de culturas de linfócitos T provenientes de pacientes com DB estimulados com diferentes mitógenos (particularmente compostos estreptocócicos) são capazes de ativar respostas inflamatórias, potencializando a quimiotaxia, a fagocitose e a produção de superóxido por neutrófilos. A IL-8, o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*) e o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) estão entre as citocinas estimuladoras das funções de neutrófilos encontradas em níveis elevados nas fases ativas da DB (Gür-Toy et al, 2005 e Kawakami et al., 2004).

O reconhecimento do MICA autólogo por LT parece, portanto, dar início ao processo autoimune da doença que culmina em reações neutrofílicas exacerbadas. Este tipo de reconhecimento de antígenos autólogos pode ocorrer por reação cruzada a antígenos microbianos semelhantes, dentre os quais as proteínas de choque térmico (que são altamente conservadas entre diferentes espécies) tornaram-se, então, as principais suspeitas. O maior conjunto de evidências sobre agentes microbianos como desencadeadores da doença acumula-se sobre os estreptococos (Mumcu et al., 2007). O papel destas bactérias gram-positivas na indução de períodos de atividade da DB foi sugerido pelo Comitê de Pesquisa em Doença de Behçet do Japão (*The Behçet's Disease Research Committee of Japan*, 1989) que reportou um número expressivo de exacerbações da DB após testes cutâneos com antígenos estreptocócicos.

Sorotipos incomuns de *Streptococcus sanguis* e anticorpos contra esta bactéria são descritos em pacientes com DB, e a proteína de choque térmico HSP-65KDa por ela expressa guarda significativa homologia com a HSP-60KDa humana, que por sua vez é expressa em quantidade aumentada nas células epiteliais das lesões cutâneas de pacientes com DB (Lehner et al., 1991). Lehner propôs, em 1997, um modelo em que a reação imune cruzada a HSPs homólogas entre estreptococcus e células humanas está na origem da DB, e períodos de reativação podem ocorrer devido a uma nova exposição do indivíduo a fatores exógenos que provocam expressão de HSPs endógenas homólogas às HSPs estreptocócicas. Tais conceitos se mantêm ainda vigentes (Kaneko et al., 2008). Em concordância com esta hipótese, o tratamento com penicilina benzatina de forma profilática promoveu redução significativa na frequência de episódios de exacerbação de sintomas mucocutâneos e articulares da DB (Calgüneri et al., 1996a,b). Adicionalmente, um modelo experimental de uveíte foi estabelecido pela administração de peptídeos derivados da HSP-65kDa a ratos Lewis (Stanford et al., 1994).

Em 1998, Merino et al. descreveram outro modelo, em ratos, em que uveíte foi induzida pela administração de outra molécula proveniente de bactérias gram-positivas, o ácido lipoteicóico (LTA, *lipoteichoic acid*). Ao contrário do modelo anterior, o LTA não é um peptídeo específico a ser reconhecido pelo sistema imune, mas uma molécula glicolipídica constituinte da parede externa das bactérias gram-positivas em geral. Desde a década de 1980, o LTA tinha reconhecidas suas propriedades biológicas como um

agente imunoestimulatório inespecífico, possuindo locais para ligação em células do sistema imune inato (Courtney et al., 1981). Apenas dezesseis anos depois, em 1997, Medzhitov et al. relataram a caracterização de proteínas humanas (análogas à proteína *toll* das drosófilas) presentes nas células do sistema imune inato que, ao serem ativadas por ligantes (moléculas associadas a patógenos microbianos), provocam a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a transcrição de diferentes citocinas pró-inflamatórias. Diferentemente dos receptores da imunidade específica, os assim chamados receptores *toll-like* (TLR, *toll-like receptor*) são proteínas não-clonais, adaptadas a reconhecer padrões moleculares presentes inespecificamente em grupos amplos de patógenos, e ativam a imunidade inata criando o ambiente pró-inflamatório necessário ao combate aos patógenos. Onze diferentes subtipos de TLRs foram descritos até o momento, sendo que os receptores TLR2 e TLR4 são receptores extracelulares que reconhecem estruturas de bactérias gram-positivas (LTA) e gram-negativas (LPS), respectivamente, em cooperação com os receptores CD14 (Roelofs et al., 2008). Através de sua ação sobre TLR2 e CD14, o LTA é capaz de estimular as funções de neutrófilos (Lotz et al., 2004) e monócitos (Schröder et al., 2003). Além disso, sabe-se que as expressões de TLR2 e CD14 nas membranas de neutrófilos são reguladas pelos fatores solúveis G-CSF e GM-CSF. Estas citocinas aumentam a expressão de TLR2 e CD14 nas membranas de PMNs e sensibilizam estas células a responder de forma exacerbada a estimulações subsequentes com agonistas de TLR2 (Kurt-Jones et al., 2002). Sugestivamente, concentrações

séricas elevadas de G-CSF são observadas nos períodos de atividade da DB (Kawakami et al., 2004).

Desse modo, a investigação da fisiopatologia da DB, que iniciou nos anos 1970 a partir de respostas neutrofílicas exacerbadas e evoluiu investigando o reconhecimento de antígenos estreptococos pela imunidade específica, retorna às células inflamatórias da imunidade inata com a constatação de que componentes estreptocócicos podem agir diretamente sobre neutrófilos e monócitos humanos de forma a ativar respostas inflamatórias. Seria possível que as células imunes inatas da DB estivessem predispostas a uma ativação exacerbada quando expostas a estreptococos, por uma disfunção do sistema de TLRs, criando o ambiente favorável à inflamação excessiva que caracteriza a doença?

Investigadores que abordaram a expressão de TLRs na DB apresentaram resultados aparentemente conflitantes. Do et al. (2008) demonstraram expressão aumentada de TLR2 e CD14 em monócitos periféricos circulantes nos casos de DB ativa; Kirino et al. (2008) identificaram TLR4 com expressão aumentada em células mononucleares do sangue periférico, mas não TLR2, e Nara et al. (2008) observaram TLR2 e TLR4 sendo ambos expressados excessivamente em lesões intestinais da DB, mas não em células mononucleares do sangue periférico. Apenas Yavuz et al. (2008) investigaram TLRs em neutrófilos da DB e não observaram diferenças na expressão de TLR2 ou TLR4. Entre as possíveis razões para essas discrepâncias, duas são particularmente relevantes do ponto de vista clínico: 1) nenhum dos estudos avaliou a atividade clínica da

doença através de instrumentos padronizados e é sugerido que a hiperexpressão de TLRs dependa do estado de atividade da DB (Do et al., 2008), então, resultados negativos poderiam ocorrer se apenas pacientes com doença inativa ou fracamente ativa forem considerados (Yavuz et al., 2008, incluíram apenas pacientes com doença inativa em seu estudo); 2) a doença de Behçet compromete diferentes sistemas orgânicos de forma variável; durante o curso da doença, pode haver inflamação grave em determinados sistemas, mas não em outros, e não está definido se todas as manifestações da DB compartilham os mesmos mecanismos fisiopatológicos. Então, estudos com amostras heterogêneas de DB podem revelar resultados contraditórios.

Além disso, embora a estimulação de PMN com agonistas de TLR promova a estimulação de diversas funções celulares, não há ainda evidências de que ocorra aumento da quimiotaxia. Testes funcionais revelaram que, sob estimulação com agonistas de TLR2 e TLR4, a migração espontânea de PMNs humanos foi aumentada, mas as respostas quimiotáticas permaneceram inalteradas (Aomatsu et al., 2008). Se os PMNs da DB teriam respostas quimiotáticas exacerbadas frente à estimulação com LTA de bactérias gram-positivas, trata-se de questão ainda não investigada (na verdade, nenhum estudo que abordou a expressão de TLR na DB correlacionou seus resultados a provas funcionais).

Apresenta-se, aqui, a hipótese de que existe hiperexpressão de TLR2 nos neutrófilos durante as fases ativas da DB, e que isto permite que estas células desempenhem respostas quimiotáticas exacerbadas, quando

expostas a bactérias gram-positivas. Esta hipótese foi verificada medindo-se a expressão de TLR2 nas membranas de neutrófilos do sangue periférico de um grupo homogêneo de pacientes com DB ativa e aferindo-se a resposta quimiotática de neutrófilos isolados desses pacientes após a estimulação com LTA. Adicionalmente, foram medidas as expressões de TLR4 e CD14, dos receptores de G-CSF (CD114) e de GM-CSF (CD116), em neutrófilos e também nos monócitos do sangue periférico. A concentração sérica de CD14 solúvel (CD14s, a contraparte solúvel do receptor CD14 de membrana) também foi medida e, porque CD14s também pode comportar-se em diferentes doenças inflamatórias como um reagente de fase aguda inespecífico dependente dos níveis de IL-6 (Bas et al., 2004), igualmente foi medida a concentração sérica de IL-6 nesses pacientes.

2. Objetivos

Medir a expressão de TLR2 em neutrófilos do sangue periférico de pacientes com DB ativa, comparando-a com a expressão de TLR2 em neutrófilos de controles saudáveis;

Aferir as respostas quimiotáticas dos neutrófilos isolados do sangue periférico de pacientes com DB ativa após estimulação com LTA, comparando-as com as respostas de neutrófilos de controles saudáveis.

Medir as expressões de TLR4, CD14, CD114 e CD116, além de TLR2, em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de pacientes com DB, comparando-as com as respectivas expressões em células de controles saudáveis.

Verificar a influência de fatores plasmáticos presentes na DB sobre a resposta quimiotática de neutrófilos.

Determinar a concentração sérica de CD14s nos pacientes com DB, correlacionando-a à concentração sérica de IL-6, à expressão de CD14 nas membranas celulares dos leucócitos circulantes e à intensidade da atividade clínica da doença.

3. Métodos

3.1. Pacientes e controles

O grupo de estudo incluiu pacientes com DB acompanhados no ambulatório de DB da Disciplina de Reumatologia, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes satisfizeram os critérios diagnósticos do ISGBD (*International Study Group for Behçet's Disease*, 1991). Foram incluídos pacientes que apresentassem manifestações mucocutâneas da DB com lesões papulospustulares, com ou sem queixas articulares. Pacientes que, no momento do estudo, tivessem confirmada ou suspeita atividade da DB afetando outros sistemas orgânicos (olhos, grandes vasos, sistema nervoso central ou trato gastrointestinal) não foram incluídos. Também foram excluídos pacientes com intercorrências infecciosas (suspeitas ou confirmadas) e com diagnóstico de outras doenças inflamatórias crônicas. A versão brasileira validada do *Behçet's Disease Current Activity Form* (BDCAF, Anexo A) foi utilizada para mensurar clinicamente a atividade da DB (Bhakta et al., 1999; Neves et al., 2007), sendo aplicada pelo mesmo observador (FSN) a todos os pacientes incluídos no estudo. Ao considerar apenas manifestações mucocutâneas e articulares da DB, o BDCAF fornece um escore associado à atividade da doença, variando de zero a trinta e dois. Três reumatologistas com experiência em DB (CRG, CGS, LVL) eram

responsáveis pelo acompanhamento dos casos durante a realização deste estudo e em cada consulta prescreveram o tratamento baseados em seu julgamento clínico, desconhecendo os escores BDCAF obtidos em cada avaliação. Os pacientes foram considerados com DB ativa quando a prescrição do reumatologista incluía a introdução ou a elevação da dose de drogas destinadas ao controle da doença (corticosteróides, colchicina, pentoxifilina, dapsona, penicilina benzatina, agentes imunossupressores ou agentes anti-TNF α – *Tumor Necrosis Factor*, fator de necrose tumoral); caso contrário, os pacientes foram considerados com DB inativa. Ao todo, 55 pacientes com DB foram incluídos no estudo, embora números diferentes tenham sido utilizados nos diferentes experimentos. Para os ensaios de quimiotaxia, solicitou-se aos pacientes que interrompessem o uso de colchicina dez dias antes da realização do experimento, de acordo com a meia-vida plasmática da droga de 48 horas (Chappey e Scherrmann, 1995). O regime terapêutico não foi modificado de nenhuma outra forma durante o estudo. Voluntários saudáveis, entre a equipe de assistência médica e de laboratório, foram incluídos como grupo controle. O estudo foi elaborado e conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki e recebeu aprovação prévia do comitê de ética da instituição (CAPPesq, protocolo número 1215/06, Anexo B). O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os indivíduos incluídos no estudo.

3.2. Medida das expressões dos receptores TLR2, TLR4, CD14, CD114 e CD116 ligados à membrana de monócitos e neutrófilos circulantes

Amostras de sangue venoso foram coletadas de 20 pacientes com DB e 20 controles saudáveis, pareados por sexo e idade, em tubos estéreis contendo EDTA. Duzentos microlitros de cada amostra foram colocados em tubos plásticos contendo 2 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS, *phosphate-buffered saline*) e azida a 0,1% e centrifugados a 2000 rpm. Às amostras celulares, foram adicionados 50 µl de PBS com azida a 0,1% e soro fetal bovino a 2%. Tais amostras foram, então, incubadas durante 20 minutos com anticorpos monoclonais não conjugados antirreceptor Fc humano (FcR Block Reagent, eBioscience, San Diego, CA, EUA), para evitar subsequente ligação inespecífica dos anticorpos conjugados aos receptores Fc de células imunes inatas. Em seguida, as amostras foram incubadas durante 20 minutos com os seguintes anticorpos monoclonais murinos, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA): anti-CD66 humano, conjugado com ficoeritrina (PE, *phycoerythrin*); anti-CD14 humano, conjugado com PerCP-Cy5.5; e anti-TLR2 humano conjugado com Alexa-Fluor®, anti-TLR4 humano biotilado (adicionando estreptavidina conjugada a isotiocianato de fluoresceína – FITC, *fluorescein isothiocyanate*) ou anti-CD116 humano conjugado a FITC. Anti-CD66 humano conjugado a FITC e anti-CD14 PerCP foram utilizados em combinação a anti-CD114 humano conjugado a PE. Em cada amostra, anticorpos conjugados controles isotípicos foram

empregados. Após a incubação, os eritrócitos foram lisados com a solução apropriada (BD Biosciences), os leucócitos restantes foram lavados duas vezes em PBS-azida a 0,1% e, posteriormente, fixados em paraformaldeído a 1% antes de serem submetidos à citometria de fluxo. Dez mil células em cada amostra foram analisados em um citômetro FACScalibur™ através do *software* CellQuest™ (BD Biosciences), com três fotodetectores. As regiões de monócitos e de PMNs foram delimitadas no gráfico de dispersão de pontos por tamanho e granularidade celulares (FSC vs. SSC, *forward scatter* vs. *side scatter*) e, dentro de cada região específica, as populações de neutrófilos e monócitos foram definidas como as células com fluorescência positiva para CD66 e CD14, respectivamente. A positividade de fluorescência foi definida através da delimitação de quadrantes no gráfico de dispersão de pontos com as amostras incubadas com os anticorpos conjugados controles isotípicos, com erro <1,5%. Posteriormente, foram determinadas as médias geométricas das intensidades de fluorescência nas populações de neutrófilos e monócitos no fotodetector FL1, como medida da expressão de TLR2, TLR4 ou CD116; no fotodetector FL2, como medida da expressão de CD114; e no fotodetector FL3, como medida da expressão de CD14, nas amostras celulares marcadas com os respectivos anticorpos conjugados.

3.3. Isolamento de PMNs do sangue periférico

Amostras de sangue venoso foram coletadas de 12 pacientes com DB e 12 controles saudáveis, pareados por sexo e idade, em seringas plásticas, sendo imediatamente adicionadas 20 unidades/ml de heparina. Após 10 minutos de centrifugação a 1500 rpm, o plasma sobrenadante foi armazenado. O depósito rico em leucócitos foi separado e centrifugado a 2000 rpm por 30 minutos em gradiente de Fycoll-Hypaque. Posteriormente, a camada rica em PMN foi separada e os eritrócitos residuais lisados em solução de cloreto de amônio (0,13M). Os PMNs isolados foram, então, suspensos em solução salina balanceada de Hanks (HBSS, *Hanks balanced salt solution*) com 0,5 mM de CaCl_2 e 1mM de MgSO_4 . Viabilidade celular maior que 95% foi verificada com o corante azul de tripan.

3.4. Avaliação da quimiotaxia de PMNs

Doze ensaios de migração de PMN foram realizados, cada um incluindo um paciente com DB e um controle saudável, utilizando uma câmara de Boyden modificada com 30 poços. Alíquotas contendo $1,5 \times 10^6$ PMNs foram colocadas nos compartimentos superiores dos poços da câmara, sendo separadas do agente quimiotático colocado no compartimento inferior por um filtro de nitrocelulose com poros de 8 μm (Millipore, Billerica, MA, EUA). Três agentes quimiotáticos diferentes foram testados para cada amostra celular: n-formil-metionina-leucil-fenilalanina $2 \times$

10^{-9} M (FMLP), leucotrieno B_4 3×10^{-7} M (LTB_4) e C5a obtido de plasma humano de controles saudáveis ativado por zymosan a 1% (todos os estímulos de Sigma, St Louis, MO, EUA). A migração espontânea de PMN de cada amostra celular também foi medida, preenchendo o compartimento inferior do poço da câmara de quimiotaxia com HBSS. A câmara de quimiotaxia foi incubada durante 60 minutos em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 a $37^\circ C$, seguido da remoção dos filtros de nitrocelulose. A migração celular foi determinada em microscopia ótica, medindo-se a distância entre a superfície do filtro e o plano mais distante ainda contendo dois PMNs, na objetiva 40x. Ensaios em duplicata foram realizados para cada conjunto de variáveis (amostra celular, agente quimiotático e pré-incubação, conforme descrita a seguir) e cinco campos de microscopia foram medidos em cada filtro. A média das dez medidas foi considerada como a medida da migração celular, e os valores da quimiotaxia estimulada foram considerados como a diferença entre a migração sob estímulo (FMLP, LTB_4 ou C5a) e migração espontânea (HBSS) para cada amostra celular.

3.5. Influência do LTA e do plasma de DB sobre a quimiotaxia de PMNs

Para avaliar a influência do LTA sobre as respostas quimiotáticas de PMNs, alíquotas contendo $1,5 \times 10^6$ PMNs obtidos de controle saudável e $1,5 \times 10^6$ PMNs obtidos de paciente com DB foram pré-incubadas por 30 minutos a $37^\circ C$ com 100 $\mu g/ml$ de LTA de *Staphylococcus aureus* (Sigma) ou com volume correspondente de HBSS (pré-incubação controle) antes de

serem colocadas nos compartimentos superiores dos poços da câmara de quimiotaxia. Para avaliar a influência de fatores plasmáticos sobre as respostas quimiotáticas dos PMN, alíquotas contendo $1,5 \times 10^6$ PMNs obtidos de controle saudável foram pré-incubadas com 200 μ l de plasma fresco obtido de doente com DB ou com 200 μ l de plasma fresco controle autólogo antes de sua colocação na câmara de quimiotaxia. Da mesma forma, alíquotas de $1,5 \times 10^6$ PMNs obtidos de doente com DB foram pré-incubadas com 200 μ l de plasma fresco de controle saudável ou 200 μ l de plasma autólogo de doente com DB antes do ensaio de quimiotaxia.

3.6. Medida da concentração sérica de CD14s e de IL-6

Amostras de sangue venoso foram coletadas de 53 pacientes com DB e 35 controles saudáveis em tubos de vidro para separação de soros e mantidos em repouso por 30 minutos para coagulação, antes da centrifugação por 15 minutos a 1000 rpm. Posteriormente, os soros foram removidos e armazenados a -70°C até a realização dos ensaios. As concentrações séricas de CD14s foram medidas através de kits de ELISA comerciais (Quantikine® Human sCD14, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A variação intraensaio indicada pelo fabricante foi de 4,8% a 6,4%. As concentrações séricas de IL-6 foram medidas também através de kit comercial de ELISA sanduíche (DuoSet® human Il-6, R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante.

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi executada utilizando-se o *software* SPSS 15.0 para Windows® (Chicago, IL, EUA). Com relação aos resultados da expressão de receptores, a comparação entre grupos foi efetuada pelo teste U de Mann-Whitney, as correlações avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman e os resultados, expressos como mediana $\pm$ variação interquartil, conforme sugerido pela distribuição não-paramétrica avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas foi calculada para avaliar as diferenças entre três ou mais grupos nos resultados dos ensaios de quimiotaxia (que empregaram três estímulos quimiotáticos diferentes). As diferenças nas concentrações séricas de CD14s e IL-6 entre grupos foram avaliadas pelo teste *t* de Student e as correlações entre estas medidas foram verificadas pelo coeficiente de correlação de Pearson, conforme sugerido pela distribuição normal destas variáveis de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov, e seus resultados expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significantes.

4. Resultados

4.1. Expressões dos receptores TLR2, TLR4, CD14, CD114 e CD116 ligados à membrana de monócitos e neutrófilos circulantes

Vinte pacientes com DB ativa (dez homens e dez mulheres; mediana de idade 41 anos, variação de 18 a 57 anos; mediana do BDCAF 5, variação de 1 a 14) e vinte controles saudáveis pareados por sexo e idade foram estudados, e apenas um paciente com DB estava em uso de corticosteróides (prednisona, 20 mg por dia). A expressão de TLR2 foi ligeiramente superior em monócitos de DB em relação a monócitos controles ($39,9 \pm 13,1$ vs. $33,6 \pm 5,3$; $p = 0,019$). Em contraste, não houve diferença significativa na expressão de TLR2 em neutrófilos DB em relação aos controles ($14,2 \pm 4,8$ vs. $12,3 \pm 5,3$; $p = 0,317$) (os resultados são apresentados como mediana $\pm$ variação interquartil, e os valores de p referem-se ao teste U de Mann-Whitney). Os receptores TLR4, CD14, CD114 e CD116 tiveram expressões similares em DB e controles saudáveis, tanto em monócitos quanto em neutrófilos circulantes (Figura 1). Não houve correlação significativa entre a intensidade da expressão dos receptores estudados e os escores BDCAF associados à atividade clínica da doença.

Figura 1. Expressão dos receptores *toll-like* (TLR) 2, TLR4, CD14, CD114 e CD116 ligados à membrana de células do sistema imune inato, circulantes no sangue periférico, em controles saudáveis vs. pacientes com doença de Behçet (DB). Caixas de cor preta expressam os dados de 20 controles saudáveis, caixas de cor cinza expressam os dados de 20 pacientes com DB ativa (* indica diferença significativa entre os grupos). Os painéis superiores (a e b) referem-se aos polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, enquanto os painéis inferiores (c e d) referem-se aos monócitos. Os eixos verticais expressam a média geométrica das intensidades de fluorescência associadas aos anticorpos monoclonais marcados para cada receptor específico, conforme avaliada pela citometria de fluxo. Expressão significativamente aumentada de TLR2 ($p = 0,019$, Mann-Whitney) foi observada apenas em monócitos de DB.

4.2. Influência do LTA sobre a função quimiotática dos PMNs

Para a avaliação das respostas quimiotáticas frente ao LTA, PMNs isolados de seis pacientes com DB ativa (três homens e três mulheres, mediana da idade 42,5 anos, com variação de 29 a 51 anos; mediana do BDCAF 4,5 com variação de 1 a 11; nenhum paciente estava em uso de corticosteróides) e seis controles saudáveis pareados foram pré-incubados com LTA ou HBSS antes dos ensaios de quimiotaxia. Houve um aumento significativo da quimiotaxia estimulada com LTA em ambas as populações celulares (DB e controles saudáveis) em relação à quimiotaxia das células incubadas com HBSS ($p = 0,005$). Porém, esse aumento da resposta quimiotática foi similar nos dois grupos celulares PMNs DB e PMNs controles ($p = 0,739$). Além disso, as intensidades das respostas quimiotáticas de PMNs de DB, como um todo, não foram superiores às respostas dos PMNs controles ($p = 0,739$). Os valores de p foram obtidos através de ANOVA com medidas repetidas, uma vez que as respostas obtidas com os três estímulos quimiotáticos foram similares (Figura 2).

Figura 2. Resposta quimiotática de polimorfonucleares (PMN) sob a influência do ácido lipoteicoico (LTA) ou solução salina balanceada de Hanks (HBSS). Os agentes quimiotáticos empregados foram LTB₄ (linha preta), FMLP (linha cinza) e C5a (linha pontilhada). Os dados expressam média ± desvio padrão da quimiotaxia estimulada em seis experimentos, medida em micrometros. Painel **a**: PMNs obtidos de controles saudáveis apresentaram respostas quimiotáticas mais expressivas quando incubadas com LTA. Painel **b**: PMNs obtidos de pacientes com DB também demonstraram maior quimiotaxia quando incubados com LTA. A influência do LTA sobre as respostas quimiotáticas foi significativa ($p = 0,005$, ANOVA), mas as respostas de PMNs DB e controles foram similares.

4.3. Influência de fatores plasmáticos sobre a função quimiotática dos PMNs

Para avaliação de respostas quimiotáticas de PMNs frente a fatores plasmáticos da DB, amostras de PMNs de doze pacientes com DB ativa (seis homens e seis mulheres; mediana da idade 43 anos, com variação de 29 a 53 anos; mediana do BDCAF 5, variação de 1 a 14; quatro pacientes estavam em uso de corticosteróides, um deles com 40 mg/dia de prednisona e três com 20 mg/dia) e doze controles pareados foram pré-incubados com plasma fresco obtido do paciente com DB ou do controle saudável antes dos ensaios de quimiotaxia. Observou-se que o uso de corticosteróides nos

experimentos com incubação com plasma de DB influenciou significativamente os resultados de quimiotaxia. Quando foram excluídos da análise os quatro casos em que os doadores de plasma estavam em uso de prednisona, observou-se que houve um aumento significativo da quimiotaxia estimulada com plasma DB em ambas as populações celulares (DB e controles saudáveis) em relação à quimiotaxia das células incubadas com plasma controle ($p = 0,033$). Esse aumento da resposta quimiotática foi também similar nos dois grupos celulares PMNs DB e PMNs controles ($p = 0,740$). No entanto, as intensidades das respostas quimiotáticas de PMNs de DB, como um todo, foram sempre significativamente superiores às respostas dos PMNs controles ($p < 0,001$). Os valores de p foram obtidos através de ANOVA com medidas repetidas, uma vez que as respostas obtidas com os três estímulos quimiotáticos foram similares (Figura 3).

Figura 3. Respostas quimiotáticas de polimorfonucleares (PMN) sob a influência de plasma de pacientes com DB ou plasma controle. Os agentes quimiotáticos empregados foram LTB4 (linha preta), FMLP (linha cinza) e C5a (linha pontilhada). Os dados expressam média $\pm$ desvio padrão da quimiotaxia estimulada em oito experimentos, medida em micrometros. Painel **a**: PMNs obtidos de controles saudáveis apresentaram respostas quimiotáticas maiores quando incubadas com plasma DB do que quando incubadas com plasma controle. Painel **b**: PMNs obtidos de pacientes com DB também desempenharam quimiotaxia exacerbada quando incubados com plasma DB. A incubação com plasma influenciou significativamente as respostas quimiotáticas ($p = 0,033$). Adicionalmente, as respostas quimiotáticas dos PMNs DB foram significativamente mais expressivas que a quimiotaxia dos PMNs controles ($p < 0,001$).

4.4. Concentração sérica de CD14 solúvel

A concentração sérica de CD14s foi medida em 53 pacientes com DB (28 mulheres e 25 homens, média de idade 41 anos com variação de 18 a 60 anos) e em 35 controles saudáveis (24 mulheres e 11 homens, média de idade 35 anos com variação de 20 a 56 anos). Os pacientes tinham BDCAF médio 5,4, com variação de zero a 24. Os níveis séricos de CD14s foram significativamente mais altos nos pacientes com DB do que em controles saudáveis ($1920,8 \pm 563,6$ ng/ml vs. $1623,2 \pm 391,3$ ng/ml, $p = 0,008$). Também foram significativamente mais elevados nos doentes com DB ativa em relação aos doentes com DB inativa ($2139,6 \pm 616,9$ ng/ml vs. $1710,1 \pm 418,9$ ng/ml, $p = 0,004$) (os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão, e os valores de p referem-se ao teste t de Student). Não houve correlação entre a concentração de CD14s e os escores BDCAF no grupo completo de pacientes; porém, no subgrupo de pacientes com doença mais intensamente ativa (escores BDCAF maior que quatro), observou-se correlação positiva significativa entre níveis séricos de CD14s e o escore associado à atividade clínica da doença (coeficiente de correlação de Pearson 0,363 com $p = 0,025$).

Observou-se correlação positiva significativa entre a concentração sérica de sCD14 e a intensidade da expressão de CD14 ligado à membrana de monócitos (coeficiente de correlação de Pearson 0,530, com $p = 0,035$). Ao contrário, não houve correlação entre os níveis séricos de CD14s e IL-6.

5. Discussão

Com as premissas de que os estreptococos são desencadeadores de períodos de atividade da DB (Kaneko et al., 2008), de que as células do sistema imune inato são diretamente ativadas por LTA de bactérias gram-positivas via TLR2 (Roelofs et al., 2008), e de que a hiperquimiotaxia de neutrófilos é a característica mais marcante da fisiopatologia da DB (Carletto et al., 1997), testou-se, neste trabalho, a hipótese de que a hiperexpressão de TLR2 estivesse associada à hiperquimiotaxia dos PMNs na DB.

Uma vez que não há inteira concordância na literatura a respeito da expressão de TLRs nas células inflamatórias de DB, decidiu-se explorar esta questão em um grupo homogêneo de pacientes com DB que compartilhassem as mesmas características clínicas. Certas associações recorrentes de órgãos-alvo têm sido relatadas na DB (Tunc et al., 2002) e a associação entre lesões cutâneas papulopustulares e artrite é bem definida (Diri et al., 2001). Portanto, nesse grupo, provavelmente, atua um mecanismo fisiopatológico semelhante em todos os casos, e esta foi a razão de terem sido consideradas as lesões papulopustulares como critérios de inclusão obrigatórios neste estudo.

A atividade da doença é outra questão que poderia influenciar os resultados de expressão de TLRs e é particularmente importante na DB, pois dificilmente há um estado crônico e sustentado de atividade inflamatória. A DB costuma cursar com períodos recorrentes e súbitos de atividade da

doença intercalados por períodos variáveis de remissão. Quantificar a atividade clínica da doença quando da avaliação de características fisiopatológicas da DB pode ser então importante. Neste estudo, empregou-se a versão brasileira do BDCAF, um instrumento originalmente desenvolvido em língua inglesa por pesquisadores de Leeds (Bhakta et al., 1999). A versão brasileira apresenta boa confiabilidade na avaliação de manifestações mucocutâneas e articulares da DB (Neves et al., 2007). Uma vez que a avaliação da atividade da DB em outros sistemas orgânicos é insuficientemente confiável com este instrumento, optou-se por excluir deste estudo os pacientes com atividade de doença ocular, gastrointestinal, em grandes vasos ou em sistema nervoso central, confirmada ou suspeita, no momento da realização dos experimentos. Tais medidas asseguraram a homogeneidade da população desse estudo.

Apenas Yavuz et al. (2008) já descreveram a expressão de TLR2 em neutrófilos de DB e concluíram não haver hiperexpressão destes receptores, embora apenas pacientes com DB inativa tenham sido incluídos em seu estudo. Os resultados do presente estudo concordam com os achados de Yavuz et al., e permitem concluir que não há significativa hiperexpressão de TLR2 nos neutrófilos circulantes da DB, mesmo na situação de doença mucocutânea ativa.

A hiperexpressão de TLR2 em monócitos, aqui demonstrada, é consistente com os achados de Do et al., (2008) que também reportaram que esta hiperexpressão é evidente apenas nos casos de doença ativa. Nara et al. (2008) também estudaram uma pequena população homogênea de

pacientes com DB intestinal e, embora tenham descrito não haver hiperexpressão de TLR2 ou TLR4 em células mononucleares do sangue periférico, observaram a expressão de ambos TLRs nas lesões intestinais da DB (em contraste à ausência de TLR2 nas lesões da doença de Crohn e à ausência de ambos TLRs na mucosa intestinal normal). Em conclusão, Nara et al. também sugerem a participação de TLR2 na patogênese da DB. Pode-se supor que a ausência de sua hiperexpressão em células mononucleares circulantes do sangue periférico possa ter ocorrido pelo pequeno número de pacientes estudados (oito casos) ou pela intensidade pouco significativa das manifestações extra-intestinais da doença (alguns casos com a forma incompleta da DB – isto é, não preenchendo totalmente os critérios diagnósticos da doença – foram incluídos em seu estudo). Em conclusão, a expressão de TLR2 é de fato aumentada nos monócitos circulantes da DB durante os períodos de atividade da doença.

Adicionalmente, observou-se no presente estudo que não há expressão aumentada dos receptores de G-CSF (CD114) e GM-CSF (CD116) nestas células, fatores envolvidos na regulação positiva da expressão de TLR2 (Kurt-Jones et al., 2002). Portanto, não se encontrou evidência de que a hiperexpressão de um receptor a montante pudesse justificar a expressão aumentada de TLR2 em monócitos de DB, que pode ser resultado, então, isoladamente, da presença dos fatores estimulantes solúveis em maior concentração na DB ativa (Kawakami et al., 2004).

Para verificar a possível importância da ativação de TLR2 na fisiopatologia da DB, seria importante demonstrar que as respostas

quimiotáticas de neutrófilos da DB podem ser amplificadas pela estimulação com LTA. Embora tenha sido observado que LTA pode aumentar as respostas quimiotáticas de PMNs de ambos grupos (DB e controle), não houve hiperquimiotaxia nos PMNs DB nestes experimentos em relação aos PMNs controles – o que é consistente com o achado de não haver expressão aumentada de TLR2 nos neutrófilos de DB em relação aos neutrófilos controles.

Apenas nos ensaios envolvendo incubação com plasma tornou-se evidente a hiperquimiotaxia de PMNs de DB. Notavelmente, até mesmo plasma normal permitiu aos neutrófilos DB desempenhar respostas quimiotáticas exacerbadas, mas plasma DB induziu respostas ainda mais exuberantes e induziu hiperquimiotaxia em PMN controles. A conclusão é que fatores solúveis estimulantes, presentes mesmo no plasma normal (mas em maior concentração no plasma DB, como parte da caracterização de um microambiente pró-inflamatório) são responsáveis pelo desenvolvimento das respostas hiperquimiotáticas de neutrófilos que caracterizam o estado ativo da DB – e são também indispensáveis, uma vez que os PMNs isolados não apresentaram hiperquimiotaxia na ausência de plasma (demonstrando que tal resposta exacerbada não ocorre devido a fatores celulares intrínsecos isoladamente). Embora este comportamento já tenha sido descrito em estudos primordiais (Sobel et al., 1977), tornou-se valioso reproduzi-lo e confirmá-lo no presente estudo, porque se esclarece controvérsia mais recente sobre quimiotaxia em BD: Tüzün et al. (1999) não reproduziram hiperquimiotaxia em PMNs isolados de pacientes com DB e questionaram a

validade dessa antiga associação entre DB e quimiotaxia de neutrófilos (apesar de descreverem uma tendência, não significativa, a respostas quimiotáticas exacerbadas em pacientes do sexo masculino com DB). Com os resultados aqui descritos, conclui-se que a hiperquimiotaxia de PMN em DB de fato ocorre, mas depende de fatores plasmáticos para ser experimentalmente verificada.

Os resultados sobre CD14s reproduziram observações feitas por outros autores sobre níveis séricos elevados desse receptor solúvel na DB, acompanhando a atividade clínica da doença (Sahin et al., 1996). Adicionalmente, a correlação aqui apresentada entre CD14s e expressão de CD14 na membrana de monócitos, na ausência de correlação com os níveis séricos de IL-6, sugere a origem predominantemente monocitária do excesso de CD14s circulante na DB ativa (em vez de uma produção em hepatócitos dependente de IL-6 como um reagente de fase aguda inespecificamente relacionado à atividade inflamatória, como foi verificado por Bas et al. em 2004 em diferentes artropatias inflamatórias). Isso reforça a importância da ativação monocitária na fisiopatologia da DB. Mege et al. (1993) já haviam demonstrado que monócitos de pacientes com DB ativa produzem excessivamente citocinas pró-inflamatórias quando estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e, particularmente, Cuchacovich et al. (2005) reportaram a produção excessiva de IL-8, uma citocina capaz de estimular a quimiotaxia de PMNs, por monócitos isolados de pacientes com DB ativa estimulados com LTA. Este último achado, especialmente, é condizente com o resultado em que se demonstrou, neste trabalho, a hiperexpressão de

TLR2 em monócitos de DB ativa. Se os monócitos na DB desempenham um papel reconhecendo bactérias gram-positivas em maior intensidade (devido à hiperexpressão de TLR2) durante as fases ativas da DB e ativando as respostas quimiotáticas de PMN exacerbadamente (através da produção aumentada de citocinas estimuladoras agindo sobre os PMNs), é uma hipótese que se impõe, e outros estudos funcionais seriam necessários para investigá-la. No presente estudo, estímulos com LTA sobre monócitos não foram contemplados – a demonstração de que fatores solúveis de origem em monócitos de DB estimulados com LTA induzissem hiperquimiotaxia de PMN seria uma evidência a favor dessa hipótese. Além disso, curiosamente, o próprio receptor CD14s de origem monocitária poderia ter um papel na regulação das funções neutrofílicas na DB. A respeito da estimulação celular frente a componentes bacterianos, o CD14s pode ter papéis diametralmente opostos: em primeiro lugar, o desprendimento de CD14 da membrana monocitária pode ter um papel contrarregulatório, uma vez que o excessivo CD14s circulante competiria com o receptor de membrana pela ligação às moléculas estimuladoras de origem bacteriana (Maliszewski, 1991). Por outro lado, já se demonstrou que o CD14s pode atuar permitindo que células endoteliais (que não expressam CD14 de membrana) sejam estimuladas por LPS circulante (Pugin et al., 1993). Os neutrófilos, que expressam CD14 de membrana em pequena intensidade, também são mais fortemente ativados por LPS ou por lipoproteína com a presença de CD14s (Troelstra et al., 1997). Sendo assim, mais que um marcador inespecífico de ativação monocitária, os níveis de CD14s poderiam influenciar as respostas

inflamatórias da DB? Estudos adicionais são necessários para confirmar esta possibilidade e definir se o papel predominante deste receptor solúvel seria anti-inflamatório ou pró-inflamatório durante os períodos de ativação da DB.

Em resumo, a hipótese inicial deste estudo foi descartada: TLR2 não apresentou-se mais expresso nos neutrófilos dos pacientes com DB, cujas respostas quimiotáticas estimuladas por LTA não foram superiores às de neutrófilos controles. Adicionalmente, verificou-se que: a hiperquimiotaxia de PMNs em DB de fato ocorre, mas é estritamente dependente de fatores estimuladores solúveis; que o TLR2 é hiperexpresso por monócitos dos pacientes com DB ativa; e que os níveis séricos de CD14s (de origem monocitária) acompanham a atividade clínica da DB. Sugere-se que pesquisas futuras possam investigar o papel das células de linhagem monocitária no reconhecimento de agentes bacterianos e na subsequente estimulação de respostas neutrofílicas através de fatores solúveis.

6. Conclusões

Não houve hiperexpressão de TLR2 em neutrófilos de pacientes com DB ativa, em relação a neutrófilos de controles saudáveis.

As respostas quimiotáticas de neutrófilos de pacientes com DB, quando estimulados com LTA, não foram superiores às respostas de neutrófilos de controles saudáveis.

A expressão de TLR2 foi significativamente superior em monócitos circulantes de pacientes com DB ativa em relação a monócitos de controles saudáveis. Não houve diferenças significativas nas expressões de TLR4, CD14, CD114 ou CD116 em monócitos ou neutrófilos entre os grupos DB e controle.

A hiperquimiotaxia de neutrófilos ocorre de fato na DB, sendo estritamente dependente de fatores estimuladores solúveis presentes no plasma.

A concentração sérica de CD14s correlaciona-se à atividade clínica da DB e tem origem monocitária.

7. Anexos

7.1. Anexo A

**Versão brasileira validada do instrumento de avaliação de atividade da
Doença de Behçet BDCAF (*Behçet's Disease Current Activity Form*)**

BR - BDCAF**FORMULÁRIO DE ATIVIDADE ATUAL DA DOENÇA DE BEHÇET (BRASIL)**

Escala de bem-estar nas últimas 4 semanas
(Paciente deve marcar o rosto escolhido)

Escala de bem-estar hoje
(Paciente deve marcar o rosto escolhido)

DADOS CLÍNICOS**ATIVIDADE****(faça as questões do item 2)**

Fadiga (“cansaço fora do normal”)		0	1	2	3	4
Cefaléia (“dor de cabeça”)		0	1	2	3	4
Úlceras orais (“boca”)		0	1	2	3	4
Úlceras genitais (“região pênis/vagina”)		0	1	2	3	4
Lesões cutâneas (“da pele”)	•Eritema nodoso ou tromboflebite superficial;	0	1	2	3	4
	•Pústulas	0	1	2	3	4
Articulações (“juntas”)	•Artralgia (“dor”)	0	1	2	3	4
	•Artrite (“inchaço quente”)	0	1	2	3	4
Gastrointestinal	• Náuseas, vômitos ou dor abdominal;	0	1	2	3	4
	•Diarréia com sangue	0	1	2	3	4

Ocular Há atividade ocular? () Sim () Não

(faça as questões do item 3)

Índice de Oculopatia de Behçet (0) (1) (2) (3) *(preenchido por oftalmologista)*

SNC Há nova atividade em sistema nervoso central? () Sim () Não

(faça as questões do item 4)

(Se "sim", responder às questões abaixo:)

Q1. () Sim () Não **Q2.** () Sim () Não **Q3.** () Sim () Não **Q4.** () Sim () Não **Q5.** () Sim () Não

Grandes vasos Há nova atividade em grandes vasos? () Sim () Não

(faça as questões do item 5)

(Se "sim", responder às questões abaixo:)

Q1. () Sim () Não **Q2.** () Sim () Não **Q3.** () Sim () Não **Q4.** () Sim () Não

Atividade da Doença de Behçet nas últimas 4
semanas: **impressão do médico**

INSTRUÇÕES

Sistema de pontuação do Formulário de Atividade

Toda a pontuação depende dos sintomas presentes nas últimas **4 semanas**. Apenas os dados clínicos que o médico julga serem devidos à Doença de Behçet devem ser considerados.

- (1) Para completar a “escala de bem-estar nas últimas 4 semanas”, faça a seguinte pergunta ao paciente:
"Aqui estão alguns rostos. Eles representam vários sentimentos, desde muito bem a muito mal-estar. Pensando apenas na sua Doença de Behçet, qual destes rostos representa melhor como você vem se sentindo nas últimas 4 semanas?"

Para completar a “escala de bem-estar hoje”, faça a seguinte pergunta ao paciente:

"Aqui estão alguns rostos. Eles representam vários sentimentos, desde muito bem a muito mal-estar. Pensando apenas na sua Doença de Behçet, qual destes rostos representa melhor como você está se sentindo hoje?"

- (2) Pontos para fadiga, cefaléia, úlceras orais e genitais, lesões cutâneas, sintomas articulares e sintomas gastrintestinais são baseados na duração dos sintomas (em semanas). Faça a seguinte pergunta completando com o sintoma a ser avaliado e marque o número correspondente de semanas:

"Nas últimas 4 semanas, durante quantas semanas no total você teve.....?"

0	sem o sintoma	
1	sintoma durante 1 semana	(1-7 dias no total)
2	sintoma durante 2 semanas	(8-14 dias no total)
3	sintoma durante 3 semanas	(15-21 dias no total)
4	sintoma durante 4 semanas	(22-28 dias no total)

- (3) Comprometimento ocular

Atividade ocular pode estar presente se algum dos seguintes sintomas está presente: (1) olho vermelho, (2) visão borrada, (3) dor ocular.

Faça então a seguinte pergunta (assinale na frase quais os sintomas presentes):

"Nas últimas 4 semanas você teve: olho vermelho (), dor no olho (), vista borrada ou reduzida ()?"

Se qualquer um destes sintomas esteve presente, ou se você acha que pode haver atividade ocular, **encaminhe o paciente ao oftalmologista que determinará o escore ocular (Índice de Oculopatia de Behçet)**

- (4) Sistema nervoso central

Faça a seguinte pergunta (assinale na frase quais os sintomas presentes):

"Nas últimas 4 semanas você teve algum desmaio, perda da consciência e da visão (), dificuldade para falar ou ouvir (), enxergando em duplo (), fraqueza ou perda da sensibilidade no rosto, braço ou perna (), perda de memória () ou perda do equilíbrio ()?"

Se todas as respostas forem “não”, então as questões Q1 a Q5 serão consideradas negativas; caso contrário, tente determinar o seguinte:

- Q 1. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento **meníngeo**?
- Q 2. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento de **par craniano**?
- Q 3. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento de **tronco cerebral ou cerebelar**?
- Q 4. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento de **hemisfério cerebral**?
- Q 5. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento da **medula espinhal**?

- (5) Grandes vasos

Faça a seguinte pergunta (assinale na frase quais os sintomas presentes):

"Nas últimas 4 semanas você teve dor no peito (), falta de ar (), tosse com sangue (), ou teve alguma dor (), inchaço ou descoloração de alguma parte do rosto (), braço () ou perna ()?"

Se todas as respostas forem “não”, então as questões Q1 a Q4 serão consideradas negativas; caso contrário tente determinar o seguinte:

- Q 1. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com **trombose venosa profunda periférica**?
- Q 2. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com **trombose venosa profunda central**?
- Q 3. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com **trombose arterial periférica ou aneurisma**?
- Q 4. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com **trombose arterial pulmonar ou aneurisma**?

7.2. Anexo B

**Parecer da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa –
CAPPesq – da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo**

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.12.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1215/06**, intitulado: **"Avaliação da função dos receptores TLR-2 e CD-14 pela ação do G-CSF/GM-CSF na atividade de neutrófilos em pacientes com Síndrome de Behçet"**, apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Suzana Beatriz Veríssimo de Mello

Pesquisador (a) Executante: Fabrício de Souza Neves

CAPPesq, 20 de dezembro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

7.3. Anexo C

Comprovante de submissão e separata do primeiro artigo submetido a
Clinical Rheumatology

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

[Main Menu](#) → [Corresponding Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Fabricio Neves

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Clinical Rheumatology*.

Manuscript ID: CR-01-2009-0022

Title: TOLL-LIKE RECEPTOR 2 EXPRESSION AND CHEMOTACTIC RESPONSES INDUCED BY LIPOTEICHOIC ACID FROM GRAM-POSITIVE BACTERIA ARE NOT ENHANCED IN BEHÇET'S DISEASE NEUTROPHILS

Authors: Neves, Fabricio
Carrasco, Solange
Gonçalves, Célio Roberto
Goldenstein-Schainberg, Claudia
Mello, Suzana

Date Submitted: 13-Jan-2009

Print Return to Dashboard

Manuscript Central™ v4.11 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2008. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

**TOLL-LIKE RECEPTOR 2 EXPRESSION AND CHEMOTACTIC
RESPONSES INDUCED BY LIPOTEICHOIC ACID FROM GRAM-
POSITIVE BACTERIA ARE NOT ENHANCED IN
BEHÇET'S DISEASE NEUTROPHILS**

Fabricio Souza Neves

Solange Carrasco

Célio Roberto Gonçalves

Cláudia Goldenstein-Schainberg

Suzana Beatriz Veríssimo de Mello

Rheumatology Division, University of Sao Paulo (USP), Brazil

Corresponding Author: Fabricio Souza Neves

Address: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Reumatologia

Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3133, Pacaembu, São Paulo, SP

CEP 01246-903, Brazil

Telephone: 55-11-30617492, Fax: 55-11-30617490, e-mail: nevesfab@bol.com.br

ABSTRACT

We wished to assess the expressions of Toll-like receptor (TLR) 2 and the correlated receptors TLR4, CD14, CD114 and CD116 on polymorphonuclear (PMN) neutrophils and monocytes of patients with Behçet's disease (BD) and to verify PMN chemotaxis under different stimulations. Our objective was to verify if BD PMNs express TLR2 excessively and if its chemotaxis can be over stimulated by lipoteichoic acid (LTA), a component of gram-positive bacteria that is a TLR2 agonist. Receptor expressions were assessed by flow cytometry. PMN chemotaxis was assessed after incubation with BD and normal plasma, LTA and Hanks solution in a Boyden chamber. On PMNs, expressions of all receptors were similar in BD and control groups. When stimulated with LTA, BD PMN cells showed chemotactic responses similar to the controls. These cells only exhibited increased chemotaxis when incubated with plasma. TLR2 expression was higher only on BD monocytes. We concluded that isolated BD PMNs does not hyperexpress TLR2 neither overreact to LTA. As additional findings, because TLR2 expression was higher on BD monocytes and BD PMN hyperchemotaxis occurred on strict dependence of soluble factors, we suggest a possible role for bacterial stimulation of monocytes in production of BD proinflammatory milieu.

Key words: Behçet's disease, chemotaxis, neutrophils, monocytes, Toll-like receptors

INTRODUCTION

Behçet's Disease (BD) is a systemic inflammatory disorder characterized by vasculitis that is often accompanied by oral and genital ulcers, skin lesions, uveitis and arthritis [1]. Its typical course consists of sudden recurrent inflammatory attacks intercalated with periods of remission. This fact suggests that BD flare-ups may be caused by occasional exposure to environmental triggers in the case of an individual with a predisposed pro-inflammatory immunologic background [2]. Polymorphonuclear (PMN) neutrophil hyperfunction has been linked to BD since 1975, when increased granulocyte chemotaxis was first described and colchicine was suggested as an efficient BD treatment [3]. Since then, PMN hyperchemotaxis is the one finding that has been most consistently linked to BD pathophysiology. This phenomenon has been reported *in vivo* and is well correlated with disease activity [4]. However, there is still controversy and some authors reported no difference of *in vitro* chemotaxis between BD and control PMN [5].

As causative triggers, streptococci have been implicated in BD, probably as a consequence of cross-reactivity between their microbial structures and host tissues [6-8]. In accordance to this hypothesis, penicillin had demonstrated benefit in BD treatment [9] and supernatants of BD T cell cultures stimulated with streptococcal preparations had accelerate PMN cell functions, including chemotaxis [10]. Additionally, besides T cell antigen recognition, human innate immune cells may act in direct response to bacterial components through a system that primarily comprises Toll-like receptors (TLR) [11]. TLR2 and TLR4 are extracellular receptors that recognize, respectively, gram-positive and gram-negative bacterial lipid-based

structures in cooperation with CD14 [12]. Lipoteichoic acid (LTA), a major component of the cell membranes of gram-positive bacteria, has been associated with stimulation of human neutrophil [13] and monocyte [14] functions via TLR2 and CD14 activation. It also has been demonstrated that expressions of TLR2 and CD14 on PMN surfaces are regulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). These soluble cytokines increase TLR2 and CD14 expression on PMN membranes, thereby priming these cells to respond swiftly after subsequent stimulation with TLR2 agonists [15].

This system may be involved in BD pathophysiology. Nevertheless, the expression of TLR2 and TLR4 in BD patients has been investigated by other authors with conflicting results. Do *et al.* reported higher expressions of TLR2 and TLR4 on circulating BD monocytes [16]; Kirino *et al.* identified increased expression of TLR4, but not of TLR2, on BD peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [17]. Nara *et al.* concluded that TLR2 and TLR4 are expressed in BD intestinal lesions, but they reported no differences between their expression levels on PBMCs of BD patients and healthy controls [18]. Only Yavuz *et al.* investigated TLR expression on BD PMN and observed no differences in TLR2 and TLR4 expressions between BD patients and controls. However, they included only patients with inactive disease [19]. Among the possible reasons for these discrepancies, two are of particular interest: 1) none of these studies measured the intensity of BD clinical activity using standardized instruments. It has been suggested that TLR hyperexpression in BD may depend on disease activity status [16], and hence false negative results may be recorded if only patients with low disease activity were studied; 2) BD is a protean

inflammatory disorder. During the course of disease, some patients present severe inflammation in certain organ systems, but not in others (*e.g.*, major vessel, gastrointestinal, central nervous system or ocular inflammation). It is unclear whether all of these manifestations share the same pathological mechanisms. If not, studies with heterogeneous BD populations may reveal conflicting results.

Furthermore, although stimulation of PMN with TLR agonists may enhance several cell functions [20], it remains unclear whether it induces PMN hyperchemotaxis. Actually, isolated human PMN exhibited downregulation of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 following LTA stimulation [21]. Recently, functional chemotactic tests were performed under stimulation with agonists of TLR2 and TLR4: the results confirmed that spontaneous PMN migration was enhanced, but chemotaxis remained unchanged [22]. Regarding chemotaxis after LTA stimulation, whether PMN from BD patients would respond differently than control PMN have not been evaluated yet. In fact, studies regarding TLR expression in BD did not correlate their findings with cellular functional assays [16-19].

Our main objectives were to measure TLR2 expression on BD PMN and to assess chemotactic responses of BD PMN under LTA stimulation. Our hypothesis was that TLR2 could be overexpressed by BD PMN during active periods of disease, leading to PMN hyperchemotaxis when stimulated by gram-positive bacterial compounds. Additionally, we measured the expression rates of TLR4 and CD14 on these cells and, because expression of these receptors is regulated by the G-CSF and GM-CSF pathways, we also assessed the expression levels of G-CSF receptor (CD114) and GM-CSF receptor (CD116), and measured the expressions of all these receptors on BD monocytes as well.

METHODS

Patients and Controls. Our study group included BD patients who were followed at the Behçet's disease outpatient clinic at the Rheumatology Division of the Hospital das Clinicas, the teaching hospital of the University of Sao Paulo, Brazil. All patients met the International Study Group criteria for the diagnosis of BD [23]. The validated Brazilian version [24] of the Behçet's Disease Current Activity Form (BDCAF) [25] was used to assess BD activity. We included patients who exhibited BD mucocutaneous manifestations with papulopustular lesions, with or without articular complaints. Patients with suspected ongoing ocular, gastrointestinal, major vessel or central nervous system BD activity were not included. We also excluded patients with suspected or diagnosed infectious episodes or who presented with other chronic inflammatory diseases. By considering only mucocutaneous and articular complaints, BDCAF offers a disease activity score range of 0-32. Healthy volunteers recruited from laboratory and hospital staffs were included as a control group. Thirty-two BD patients (18 female, 14 male, median age 42.0 years, range 18-60 years) and 32 healthy controls (matched according age and gender) were included. BD patients had a median BDCAF score of 4.0, range 1-24. Twenty patients were taking colchicine, while 13 patients were on prednisone, four on azathioprine, three on thalidomide, three on pentoxifylline, two on cyclosporine, two on penicillin, one on dapsone and one on mycophenolate mofetil. For the purpose of the chemotaxis assay, twelve patients were asked to stop taking colchicine ten days before the start of the investigation. The therapeutic regimen was otherwise unadjusted during the study. Our study design was consistent with the principles of the Declaration of

Helsinki and received institutional ethics committee approval (CAPPesq, protocol number 1215/06). Written informed consent was obtained from all subjects prior to study commencement.

Assessment of membrane-bound expressions of TLR2, TLR4, CD14, CD114 and CD116 on circulating monocytes and PMNs. Venous blood samples were taken from 20 BD patients (median BDCAF 5, range 1-14) and 20 normal controls in EDTA tubes. Two hundred microlitres of each sample was placed in tubes containing 2 ml of 0.1% azide in phosphate-buffered saline (PBS), centrifuged at 2000 rpm for 3 minutes and mixed with 50 μ l of 2% foetal calf serum (FCS) and 0.1% azide-PBS. Afterwards, cell samples were incubated for 20 minutes with unconjugated anti-human Fc Receptor (FcR Block Reagent, eBioscience, San Diego, CA, USA) to avoid subsequent unspecific adhesion of labelled monoclonal antibodies (mAb) to Fc receptors on innate immune cells. Following the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), cells were stained with the following mAbs: phycoerythrin (PE) conjugated mouse anti-human CD66 mAb, as a specific marker of PMN (FL2), PerCP-Cy5.5 conjugated mouse anti-human CD14 mAb (FL3) and Alexa-Fluor® conjugated mouse anti-human TLR2, biotinylated mouse anti-human TLR4 mAb (added to streptavidin labelled with fluorescein isothiocyanate – FITC) and FITC conjugated mouse anti-human CD116 mAb (FL1) or isotype control antibody for 20 minutes. FITC conjugated anti-human CD66 (FL1) was used as a PMN marker with PE conjugated mouse anti-human CD114 (FL2). Erythrocytes were lysed with appropriated lysing solution (BD Biosciences), and stained cells were washed twice in 0.1% azide-PBS solution and fixed in 1% paraphormaldehyde

prior to flow cytometric analysis. Ten thousand cells from each sample were then analyzed in a three-fluorescence detector FACScalibur™ device with CellQuest™ software (BD Biosciences). PMN and monocyte regions were gated in the forward scatter/side scatter chart. In each specific region, PMNs and monocytes were defined as CD66+ or CD14+ cells, respectively. After that, the FL-3 geometric mean fluorescence intensity was assessed as a measure of membrane-bound CD14 expression. FL-1 geometric mean intensity of fluorescence was measured as a means of monitoring TLR2, TLR4 or CD116 expression. The FL-2 geometric mean fluorescence intensity indicated CD114 expression.

Isolation of peripheral blood PMN. Venous blood samples from 12 BD patients (median BDCAF 4, range 1-24) and 12 controls were collected in plastic syringes and immediately mixed with 20 units/ml of heparin. After 10 minutes of centrifugation at 1500 rpm, the supernatant plasma was stored. The leukocyte-rich plasma was separated and centrifuged at 2000 rpm for 30 minutes in a Ficoll-Hypaque gradient. The PMN-rich pellet was separated, and lysis of the erythrocytes was performed using ammonium chloride solution (0.13 M). The purified cells were then resuspended in Hanks balanced salt solution (HBSS) with 0.5 mM and 1 mM of CaCl₂ and MgSO₄, respectively. Cell viability > 95% was assessed with trypan-blue dye exclusion.

Assessment of chemotaxis. Twelve PMN migratory assays, each of which included one BD patient and one gender and age matched healthy control, were performed using a multi-well chemotaxis chamber. Briefly, aliquots containing 1.5×10^6 PMN

cells (obtained as described above) were added to the upper compartment of the chamber and were separated from the chemotactic agent in the lower compartment by a cellulose nitrate filter of 8 μm average pore size (Millipore, Billerica, MA, USA). Three different chemotactic agents were used for each cell sample: n-formylmethionine leucyl-phenylalanine, 2×10^{-9} M (FMLP), leukotriene B₄, 3×10^{-7} M (LTB₄) and human C5a obtained from normal human plasma activated by 1% zymozan (all stimuli purchased from Sigma, St Louis, MO, USA). Free, non-stimulated PMN migration was also assessed. This system was incubated in humidified 5% CO₂ air at 37°C for 60 min, followed by removal of the filters for fixation and staining of the cells. PMN migration within each filter was determined under light microscopy by the “leading front” method, in which the distance was measured from the top of the filter to the furthest plane that still contained two cells under a 40x zoom objective view. We made duplicate wells for every set of variables (cell sample, pre-incubation as described below and chemotactic agent). Five fields were counted and averaged for each filter, and the value of the stimulated chemotaxis was considered as the difference (Δ) between migration with stimulation (FMLP, LTB₄ or C5a) and spontaneous (non-stimulated) PMN migration.

BD plasma influence and LTA influence on PMN chemotaxis. In order to investigate the action of BD plasma factors on chemotaxis, samples containing 1.5×10^6 control PMN and 1.5×10^6 BD PMN were pre-incubated with 200 μl of plasma either from BD patients or from control healthy donors for 30 min at 37°C before being transferred to the chemotaxis chamber and undergoing the migratory assay procedure as described above. This was repeated for all twelve chemotaxis

experiments. To assess LTA influence on PMN migratory response, samples with 1.5×10^6 normal control PMN and 1.5×10^6 BD PMN were pre-incubated for 30 min at 37°C with $100 \mu\text{g/ml}$ LTA from *Staphylococcus aureus* (Sigma) before being placed in the chemotaxis chamber. This was repeated for six different chemotaxis experiments.

Statistical analysis. All analyses were performed with the SPSS 15.0 for Windows® (Chicago, IL, USA) statistical software package. For results concerning membrane receptor expression rates, comparisons between groups were carried out using the Mann-Whitney U test and results are expressed as median $\pm$ interquartile range, consistent with a non-parametric distribution as assessed by the Shapiro-Wilk test. A univariate analysis of variance (ANOVA) with repeated measures was calculated to assess the differences between three or more groups in the chemotaxis essays. Values of p under 0.05 were considered significant.

RESULTS

Expression of membrane-bound receptors TLR2, TLR4, CD14, CD114 and CD116 on BD PMN and monocytes. TLR2 expression level was found to be slightly higher on BD monocytes than on controls (39.9 ± 13.1 vs 33.6 ± 5.3 , $p = 0.019$). In contrast, there was no significant difference in TLR2 expression rates between BD and control PMN. TLR4 and CD14 expression levels on both BD monocytes and PMN were similar than on controls. Also, we found no difference in

CD114 and CD116 expression rates between BD and control cells (Fig. 1). Only one patient was taking prednisone (20 mg/day).

BD plasma influence on PMN chemotactic function. Twelve BD patients and twelve healthy controls were enrolled in the chemotaxis assays. Four patients were taking prednisone (one at 40 mg/day, three at 20 mg/day). PMNs obtained from controls (control PMN) were pre-incubated with their own fresh plasma or with BD fresh plasma, and PMNs obtained from BD patients (BD PMN) were pre-incubated with their own fresh plasma or with control fresh plasma prior to the chemotaxis assay, as described in the methods section. Concerning plasmatic influence on chemotaxis: overall, pre-incubation with BD or with control plasma did not have a significant effect on results ($p = 0.065$), but we observed that corticosteroid from BD patients significantly influenced these results. When we excluded the 4 experiments in which control PMN were pre-incubated with plasma from BD patients taking corticosteroids, we observed that pre-incubation with BD plasma enhanced PMN chemotactic responses ($p = 0.033$). Regarding the specific cell used for these experiments, BD PMN was associated with significantly higher overall chemotactic responses than control PMN ($p < 0.001$), but both cell groups exhibited similarly strengthened chemotaxis under the influence of BD plasma ($p = 0.740$). All the p values were calculated using univariate repeated measures ANOVA (Fig. 2).

LTA influence on PMN chemotactic function. During the chemotaxis experiments described above, PMN isolated from six BD patients and from six healthy controls were also pre-incubated with LTA or HBSS (without plasma) before the assay. There

was a significant increase in stimulated chemotaxis with LTA pre-incubation of both normal PMN and BD PMN ($p = 0.005$). Regarding the specific cells used for these experiments, BD PMN failed to show higher overall chemotactic responses than control PMN ($p = 0.528$). Both cell groups exhibited similar accelerated chemotaxis under the influence of LTA ($p = 0.739$). All p values were obtained from univariate repeated measures ANOVA (Fig. 3).

DISCUSSION

Since streptococcal triggering of BD inflammatory flare-ups is recognized [26] and innate immune cells can be activated by microbial compounds via the Toll-like receptor system [11-14], our objective was to correlate the possible hyperexpression of TLR2 to PMN hyperchemotactic responses (although still controversial, it is the most characteristic pathophysiologic finding in BD).

Because there is no agreement in the literature regarding TLR expression rates on BD inflammatory cells, we decided to explore this question using a homogeneous group of BD patients who shared the same clinical characteristics. Certain recurrent target organ associations have been linked to BD [27], and the association between papulopustular skin lesions and arthritis is now well defined [28]. Therefore, within this group, there is probably a common pathologic mechanism, and this is the reason that we defined papulopustular skin lesions as an obligatory manifestation for our study's inclusion criteria.

Disease activity is another question that may influence TLR expression. It is particularly difficult to deal with this question in BD patients because no chronic

state of active inflammation actually exists. BD is associated with sudden attacks of inflammation, of variable intensity, intercalated by periods of remission. Some effort must be made, therefore, to quantify the intensity of disease activity when assessing BD inflammatory phenomena. We employed the validated Brazilian version of the BDCAF, an instrument originally developed for English language users by researchers from Leeds, UK [25]. The Brazilian version was considered reliable to assess mucocutaneous and articular manifestations of BD in another study [24]. Because measurement of BD activity in other organ systems is insufficiently reliable with this instrument, we decided not to include BD cases with suspected ongoing ocular, gastrointestinal, major vessel or central nervous system inflammation.

Before our study, only Yavuz *et al.* had ever described TLR2 expression on BD PMN and they reported no hyperexpression of this receptor on these cells [19]. However they included only patients with inactive BD, their results are in accordance to our findings in patients with active disease, thus we conclude that TLR2 expression on BD PMN is not upregulated, irrespective of disease activity status.

Our results showed hyperexpression of TLR2 on BD monocytes, consistent with the findings of Do *et al.* These authors also described that TLR2 hyperexpression was evident only in active BD cases [16]. Nara *et al.* also studied a small population of relatively homogeneous BD cases with intestinal inflammation. Although they found that PBMC expression levels of TLR2 and TLR4 were the same in BD and in control subjects, the expression of both TLRs was observed in BD intestinal samples (in contrast to the absence of TLR2 in Crohn's disease and the absence of both TLRs in normal intestinal mucosa) [18]. Consequently, data from Nara *et al.* also suggest the involvement of TLR in BD cases. We believe that a lack

of TLR hyperexpression in peripheral blood cells may have occurred if extraintestinal manifestations in the cases studied were extremely mild (although the clinical scenarios were described, data on the intensity of clinical signs have not been published). Hence, we suggest that expression of TLR2 is upregulated on BD monocytes during the active periods of disease.

To verify the link between TLR2 hyperexpression and BD pathophysiology, it would be important to demonstrate that chemotactic responses of BD PMN can be enhanced following LTA stimulation. Although we observed that LTA can stimulate both control and BD PMN chemotaxis, there were not higher chemotaxis rates from BD PMN in these experiments. This is consistent with the finding of no TLR2 hyperexpression on BD PMN.

Only during experiments with plasma incubation, it did become evident that BD PMN cells exhibited stronger chemotactic responses. Of note, even the control plasma encouraged BD PMN cells to exhibit enhanced chemotaxis, but BD plasma induced even higher chemotaxis rates. Hence, we suggest that soluble factors that are present even in normal plasma (but that are more concentrated in BD plasma samples) are necessary for stimulating PMN chemotactic responses that characterize the BD active state. Although this had been previously verified by Sobel *et al* in primeval studies [29], we consider that it was worthwhile to experimentally confirm it in our work because it may clarify relentless controversy about PMN chemotaxis and BD [5]: in conclusion, we suggest that BD PMN hyperchemotaxis really occurs, but is strictly dependent on the proinflammatory microenvironment of disease activity. Mege *et al.* had already suggested that monocytes may play a role in BD pathogenesis, by overproducing proinflammatory cytokines that trigger PMN

functions [30], and Cuchacovic *et al.* demonstrated that mononuclear cells isolated from patients with active BD had increased secretion of IL-8 when stimulated with LTA [31]. This latter finding is particularly consistent with our results of TLR2 hyperexpression on BD monocytes and suggests a possible role for monocytes in BD by producing stimulating factors for PMN chemotaxis.

In conclusion, our initial hypothesis has been discarded: TLR2 was not hyperexpressed on BD PMNs, and isolated BD PMNs do not develop hyperchemotactic responses when stimulated with LTA. As additional findings, we confirmed that BD PMNs perform hyperchemotaxis (but it strictly depends on soluble proinflammatory factors) and TLR2 is overexpressed on BD monocytes. Thus we suggest that further investigation on BD bacterial triggering may focus on the role of monocyte stimulation via TLR2 and overproduction of cytokines that would activate PMN hyperfunction.

Disclosure statement: Neves FS, none; Carrasco S, none; Gonçalves CR, none; Goldenstein-Schainberg C, none; Mello SBV, none.

Acknowledgements: We are grateful to Maria Aurora Gomes da Silva and Maria de Fátima de Almeida for their contributions to our laboratory chemotaxis experiments, to Rogério Ruscitto do Prado for statistical assistance and to Janet Fu McDevitt for reviewing our English-language manuscript. Discussions with many colleagues were important during this study, but we are particularly grateful to Dr. Roger Chammas, Ph.D. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Grant number 2007/52448-4].

REFERENCES

1. Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H (2004) Behçet syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 16:38-42.
2. Direskeneli H (2006) Autoimmunity vs autoinflammation in Behçet's disease: do we oversimplify a complex disorder? *Rheumatology* 45:1461-5.
3. Matsumura N, Mizushima Y (1975) Leucocyte movement and colchicine treatment in Behçet's disease. *Lancet* 2:813.
4. Carletto A, Pacor ML, Biasi D *et al* (1997) Changes of neutrophil migration without modification of *in vitro* metabolism and adhesion in Behçet's disease. *J Rheumatol* 24:1332-6.
5. Tüzün B, Tüzün Y, Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H, Ozyazgan Y (1999) Neutrophil chemotaxis in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 58:658.
6. The Behçet's Disease Research Committee of Japan (1989) Skin hypersensitivity to streptococcal antigens and the induction of systemic symptoms by the antigens in Behçet's disease – a multicenter study. *J Rheumatol* 16:506-11.
7. Lehner T (1999) Immunopathogenesis of Behcet's disease. *Ann Med Interne (Paris)* 150:483-7.
8. Direskeneli H, Eksioglu-Demiralp E, Yavuz S *et al* (2000) T cell responses to 60/65 kDa Heat Shock protein derived peptides in Turkish patients with Behçet's disease. *J Rheumatol* 27:708-13.

9. Calguneri M, Kiraz S, Ertenli I, Benekli M, Karaarslan Y, Celik I (1996) The effect of prophylactic penicillin treatment on the course of arthritis episodes in patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 39:2062-5.
10. Niwa Y, Mizushima Y (1990) Neutrophil-potentiating factors released from stimulated lymphocytes; special reference to the increased in neutrophil-potentiating factors from streptococcus-stimulated lymphocytes of patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 79:353-60.
11. Medzhitov R, Hurlburt-Preston P, Janeway CA Jr (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signs activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-7.
12. Roelofs MF, Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LAB, van den Berg WB, Radstake TRDJ (2008) The orchestra of Toll-like receptor and their potential role in frequently occurring rheumatic conditions. *Arthritis Rheum* 58:338-48.
13. Lotz S, Aga E, Wilde I *et al* (2004) Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leuk Biol* 75:467-77.
14. Schröder NWJ, Morath S, Alexander C *et al* (2003) Lipoteichoic Acid (LTA) of streptococcus pneumoniae and staphylococcus aureus activates immune cells via toll-like receptor (TLR)-2, lypopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 278:15587-94.

15. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C *et al* (2002) Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR-2 mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 100:1860-8.
16. Do JE, Kwon SY, Park S, Lee ES (2008) Effects of vitamin D on expression of Toll-like receptors of monocytes from patients with Behçet's disease. *Rheumatology* 47:840-8.
17. Kirino Y, Takeno M, Watanabe R *et al* (2008) Association of reduced heme oxygenase-1 with excessive Toll-like receptor 4 expression in peripheral blood mononuclear cells in Behçet's disease. *Arthritis Res Ther* 10:R16
18. Nara K, Kurokawa MS, Chiba S *et al* (2008) Involvement of innate immunity in the pathogenesis of intestinal Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 152:245-51.
19. Yavuz S, Elbir Y, Tulunay A, Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H (2008) Differential expression of toll-like receptor 6 on granulocytes and monocytes implicates the role of microorganisms in Behçet's disease etiopathogenesis. *Rheumatol Int* 28:401-6.
20. Sabroe I, Prince LR, Jones EC *et al* (2003) Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 170:5268-75.
21. Sabroe I, Jones EC, Whyte MKB, Dower SK (2005) Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology* 115:90-8.

22. Aomatsu K, Kato T, Fujita H *et al* (2007) Toll-like receptor agonists stimulate human neutrophil migration via activation of mitogen-activated protein kinases. *Immunology* 123:171-80.
23. International Study Group for Behçet's Disease (1991) Criteria for diagnosis of Behçet's Disease. *Lancet* 335:1078-80.
24. Neves FS, Moraes JCB, Kowalski SC, Goldenstein-Schainberg C, Lage LV, Gonçalves CR (2007) Cross-cultural adaptation of the Behçet's Disease Current Activity Form (BDCAF) to Brazilian Portuguese language. *Clin Rheumatol* 26:1263-7.
25. Bhakta BB, Brennan P, James TE, Chamberlain MA, Noble BA, Silman AJ (1999) Behçet's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity. *Rheumatology* 38:728-33.
26. Mumcu G, Inanc N, Yavuz S, Direskeneli H (2007) The role of infectious agents in the pathogenesis, clinical manifestations and treatment strategies in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 25(4 Suppl 45):S27-33.
27. Tunc R, Keyman E, Melikoglu M *et al* (2002) Target organ associations in Turkish patients with Behçet's disease: a cross sectional study by exploratory factor analysis. *J Rheumatol* 29:2393-6.
28. Diri E, Mat C, Hamuryudan V, Yurdakul S, Hizli N, Yazici H (2001) Papulopustular skin lesions are seen more frequently in patients with Behçet's syndrome who have arthritis: a controlled and masked study. *Ann Rheum Dis* 60:1074-6.

29. Sobel JD, Haim S, Obedeau N, Meshulam T, Merzbach D (1977) Polymorphonuclear leukocyte function in Behçet's disease. J Clin Pathol 30:250-3.
30. Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V *et al.* (1993) Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL-8 and increase neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. J Rheumatol 20:1544-9.
31. Cuchacovich M, Merino G, Yamamoto JH *et al* (2005) Behçet's disease patients present high levels of deglycosylated anti-lipoteichoic acid IgG and high IL-8 production after lipoteichoic acid stimulation. Clin Exp Rheumatol 23(4 Suppl.38):S27-S34.

Fig. 1 Expression of membrane-bound Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, CD14, CD114 and CD116 in healthy controls vs. Behçet's disease (BD) patients on innate immune cells in peripheral blood. Black boxes express data from 20 healthy controls, grey boxes express data from 20 BD patients (* indicates significant differences between groups). Upper panels (a and b) refer to monocytes while lower panels (c and d) involve polymorphonuclear (PMN) cells. Vertical axes express geometric mean intensities of the fluorescence associated with labelled monoclonal antibodies for each specific receptor as assessed by flow cytometry. Slight but statistically significant higher expression of TLR2 ($p = 0.019$) was found only on BD monocytes.

Fig. 2 Chemotactic response of polymorphonuclear (PMN) cells under the influence of Behçet's disease (BD) or normal plasma. Chemoattractants were LTB₄ (black line), FMLP (grey line) and C5a (dotted line). Data labels express estimated marginal means $\pm$ standard deviation associated with stimulated chemotaxis during 8 experiments, measured in micrometers. Plasma incubation significantly influenced chemotactic responses ($p = 0.033$). In panel a, PMN collected from controls showed higher chemotaxis values when incubated with BD plasma than when incubated with normal plasma. In panel b, BD PMN incubated with BD plasma also exhibited higher chemotactic responses than those incubated with normal plasma. In addition, overall BD PMN chemotactic responses were higher than those of control PMN ($p < 0.001$).

Fig. 3 Chemotactic response of polymorphonuclear (PMN) cells under the influence of lipoteichoic acid (LTA) or Hanks Balanced Salt Solution (HBSS). Chemoattractants were LTB₄ (black line), FMLP (grey line) and C5a (dotted line). Data labels express estimated marginal means $\pm$ standard deviation of stimulated chemotaxis from 6 experiments, measured in micrometers. Panel a: PMN collected from controls showed higher chemotaxis values when incubated with LTA than when incubated with HBSS. Panel b: Behçet's disease (BD) PMN incubated with LTA also exhibited higher chemotactic responses than did those incubated with HBSS. The influence of LTA on BD and on control PMN was statistically significant ($p = 0.005$). However, the chemotactic responses of BD and control PMN were identical.

7.4. Anexo D

Comprovante de submissão e separata do segundo artigo submetido a
Clinical Rheumatology

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Clinical Rheumatology*.

Manuscript ID: CR-01-2009-0023

Title: MONOCYTE-DERIVED SOLUBLE CD14 CORRELATES WITH BEHÇET'S DISEASE ACTIVITY: A POSSIBLE INFLUENCE ON INFLAMMATORY RESPONSES?

Authors: Neves, Fabricio
 Carrasco, Solange
 Gonçalves, Célio Roberto
 Lage, Lais
 Goldenstein-Schainberg, Claudia
 Mello, Suzana

Date Submitted: 13-Jan-2009

Print
 Return to Dashboard

Manuscript Central™ v4.11 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2008. All Rights Reserved.
 Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

**MONOCYTE-DERIVED SOLUBLE CD14 CORRELATES WITH BEHÇET'S
DISEASE ACTIVITY: A POSSIBLE INFLUENCE ON INFLAMMATORY
RESPONSES?**

Fabricio Souza Neves

Solange Carrasco

Célio Roberto Gonçalves

Lais Verderame Lage

Cláudia Goldenstein-Schainberg

Suzana Beatriz Veríssimo de Mello

Rheumatology Division, University of Sao Paulo (USP), Brazil

Corresponding Author: Fabricio Souza Neves

Address: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Reumatologia

Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3133, Pacaembu,

CEP 01246-903 Sao Paulo, SP, Brazil

Telephone: 55-11-30617492 Fax: 55-11-30617490 e-mail: nevesfab@bol.com.br

ABSTRACT

Soluble CD14 (sCD14) is the soluble counterpart of CD14, an auxiliary receptor of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR 4 in recognizing bacterial compounds which may be involved in Behçet's disease (BD) pathophysiology. Two major sources of sCD14 have been identified: shedding from monocytes membrane and hepatocyte production induced by interleukin-6 (IL-6) as an acute phase protein. Because raised serum concentrations of sCD14 have been described in BD, our objectives were to correlate sCD14 levels with disease activity and to identify the source of sCD14 in these cases. Fifty-three BD patients were evaluated. Serum sCD14 and IL-6 concentrations were quantified by ELISA. Membrane-bound CD14 expression on peripheral blood monocytes was assessed by flow cytometry. All patients met the diagnostic criteria of the International Study Group for BD, and BD activity was assessed by BDCAF (Behçet's Disease Current Activity Form). Serum concentration of sCD14 was higher in BD patients than in controls (1920.8 ± 563.6 ng/ml vs. 1623.2 ± 391.3 ng/ml, $p = 0.008$) and it was also higher in active BD cases than in inactive ones (2139.6 ± 616.9 ng/ml vs. 1710.1 ± 418.9 ng/ml, $p = 0.004$). Levels of sCD14 correlate positively with BDCAF scores and with membrane expression of CD14 on monocytes, but not with IL-6 concentrations. We concluded that serum concentration of sCD14 correlates with BD activity and its major source is shedding from monocytes membrane.

Key words: Behçet's disease, CD14, monocytes, innate immunity

INTRODUCTION

Behçet's disease (BD) is an inflammatory disorder characterized by oral and genital ulcers, skin lesions, uveitis and arthritis [1]. Although its etiopathogenesis remains mostly unclear, neutrophil hyperfunction is considered a hallmark of the disease [2-4] and some BD flare-ups are closely related to streptococcal exposure, probably due to molecular mimicry regarding human and microbial heat shock proteins (HSP) [5-7].

Because Toll-like receptors (TLR) were recently described as key activators of innate immune system by recognizing microbial patterns [8], its possible role in BD has been investigated. TLR2 and TLR4 are extracellular receptors that recognize, respectively, gram-positive and gram-negative bacterial lipid-based structures in cooperation with CD14 molecules [9]. These receptors are of particular interest in BD because they are also activated by HSP60, a human homologue of bacterial HSP [7]. Interestingly, TLR2 hyperexpression was observed on BD peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [10], but not on neutrophils [11]. This suggests that BD neutrophils are not intrinsically hyperreactive to bacterial compounds, but depend on a proinflammatory milieu to produce exacerbated responses. Actually, neutrophil functions can be stimulated *in vitro* by BD plasma [12], and several proinflammatory cytokines produced by lymphocytes [13] and monocytes [14] are probably responsible for this feature.

Moreover, soluble CD14 (sCD14) was observed in higher concentrations in BD patients [15] and it may also play a role in neutrophil stimulation. A major source of sCD14 is shedding from monocytes membrane and, as a soluble

counterpart of membrane-bound CD14, sCD14 has complex effects interacting with TLRs in different cell types: it may inhibit or enhance cell responses depending on several variables, like membrane CD14 expression levels and lipopolysaccharide binding protein (LBP) concentration [16]. However, sCD14 serum levels are also increased unspecifically in several inflammatory conditions, produced by hepatocytes as an acute-phase protein regulated by IL-6 concentration [17]

We intended to investigate if sCD14 serum concentration in BD is related to BD activity and if it has monocyte or hepatocyte origin. Thus, we measured serum sCD14 and IL-6 concentrations, assessed membrane-bound CD14 expression on peripheral blood monocytes and evaluated clinical disease activity in patients with BD.

METHODS

Patients and Controls. Our study group included BD patients who were followed at the Behçet's disease outpatient clinic at the Rheumatology Division of the Hospital das Clinicas, the teaching hospital of the University of Sao Paulo, Brazil. All patients met the International Study Group criteria for the diagnosis of BD [18]. We excluded patients with suspected or diagnosed infectious episodes or who presented other chronic inflammatory diseases. The same observer (FSN) used the validated Brazilian version [19] of the Behçet's Disease Current Activity Form (BDCAF) [20] to assess BD activity of all patients. Three senior rheumatologists with expertise in BD, who were blind about BDCAF scores (CRG, CGS and LVL) were responsible for following the patients and prescribed medications according to their clinical

judgement. BD patients were considered to have active disease when prescription drugs included the introduction or dosage elevation of corticosteroids, colchicine, pentoxifilline, dapsone, benzathine penicillin, or immunosuppressive agents. Otherwise, they were considered inactive BD cases. Healthy volunteers recruited from laboratory and hospital staffs were included as a control group. Our study design was consistent with the principles of the Declaration of Helsinki and received institutional ethics committee approval (CAPPesq, protocol number 1215/06). Written informed consent was obtained from all subjects prior to study commencement.

Measurement of serum sCD14 and IL-6. Peripheral venous blood samples from 53 BD patients and 35 healthy controls were collected in serum separator glass tubes and were allowed to clot for 30 minutes before centrifugation for 15 minutes at 1000 rpm. After that, serum was removed and stored at -70 °C until assay procedure. Soluble CD14 levels in sera were determined using a commercial ELISA kit (Quantikine® Human sCD14, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Intra-assay variation indicated by the manufacturer was 4.8-6.4%. IL-6 levels were assessed in 36 BD serum samples by developing a sandwich ELISA assay using a commercial system (DuoSet® human IL-6, R&D Systems), following manufacturer's instructions.

Assessment of CD14 membrane-bound expressions on circulating monocytes. Venous blood samples were taken from 16 BD patients. Two hundred microliters of each sample were placed in tubes containing 2 ml of 0.1% azide in phosphate-

buffered saline (PBS), centrifuged at 2000 rpm for 3 minutes and mixed with 50 μ l of 2% fetal calf serum (FCS) and 0.1% azide-PBS. Afterwards, cell samples were incubated for 20 minutes with unconjugated anti-human Fc receptor (FcR Block Reagent, eBioscience, San Diego, CA, USA) to avoid subsequent unspecific adhesion of labeled monoclonal antibodies (mAb) to Fc receptors on innate immune cells. Following the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), cells were stained with phycoerythrin (PE) conjugated mouse anti-human CD14 mAb. Erythrocytes were lysed with appropriated lysing solution (BD Biosciences), and stained cells were washed twice in 0.1% azide-PBS solution and fixed in 1% paraformaldehyde prior to flow cytometric analysis. Ten thousand cells from each sample were then analyzed in a FACScalibur™ device with CellQuest™ software (BD Biosciences). Monocyte regions were gated in the forward scatter/side scatter chart and monocytes were defined as CD14⁺ cells. After that, the FL-2 geometric mean fluorescence intensity was assessed as a measure of membrane-bound CD14 expression.

Statistical analysis. All analyses were performed with the SPSS 15.0 for Windows® (Chicago, IL, USA) statistical software package. Student's *t* test was used to compare serum sCD14 and IL6 concentrations between groups and Pearson's correlation coefficient was used to assess correlations between two variables, as suggested by normality distribution assessed by Kolmogorov-Smirnov test. Except where indicated, results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Values of *p* under 0.05 were considered significant.

RESULTS

Fifty-three BD patients (28 female, 25 male, mean age 41.0 years, range 18-60 years) and 35 healthy controls (24 female, 11 male, mean age 35.0 years, range 20-56 years) were included. BD patients had a mean BDCAF score of 5.4, range 0-24.

Serum concentration of sCD14 was found higher in BD patients than in the control group (1920.8 ± 563.6 ng/ml vs. 1623.2 ± 391.3 ng/ml, $p = 0.008$, Fig. 1a). It was also higher in active BD patients than in inactive cases (2139.6 ± 616.9 ng/ml vs. 1710.1 ± 418.9 ng/ml, $p = 0.004$, Fig. 1b). BDCAF scores and sCD14 were not correlated in the overall BD group, but in the subgroup with BDCAF scores higher than four ($n = 38$) there was a significant positive correlation between sCD14 levels and disease activity scores (Pearson's correlation coefficient 0.363, $p = 0.025$).

There was a significant positive correlation between sCD14 serum levels and monocytes membrane-bound CD14 expression (Pearson's correlation coefficient 0.530, $p = 0.035$, Fig. 2a), but not between serum sCD14 and IL-6 concentrations (Fig. 2b).

DISCUSSION

Our results confirm previous observation of elevated sCD14 levels in sera of BD patients [15]. Additionally, we correlated sCD14 concentration in BD with clinically assessed disease activity and found evidence that shedding from monocytes

membrane is the major source of excessive sCD14 in these cases. This reinforces the importance of monocyte activation in BD inflammatory responses.

Because neutrophil hyperfunction is a characteristic finding in BD, proinflammatory cytokines probably constitute the link between monocyte activation and neutrophil responses [14]. However, it must be considered that sCD14, from monocyte origin, may also play a role in neutrophil stimulation. Interestingly, sCD14 has dual effects regarding cell stimulation induced by bacterial components. Shedding of CD14 from monocytes membrane may constitute a down-regulation mechanism of LPS-induced activation, because sCD14 competes with membrane-bound CD14 to LPS interaction [21]. In the opposite way, sCD14 was shown to enable endothelial cells, which do not express membrane CD14, to respond to LPS [22]. Neutrophils, which express low levels of membrane CD14, also achieved more prominent activation induced by LPS or by lipoprotein with the addition of sCD14 [16,23].

In conclusion, we observed that serum concentration of sCD14 correlates with BD activity and its major source is shedding from monocytes membrane. Because sCD14 may interfere in cell activation induced by bacterial compounds, we suggest that excessive sCD14 in BD patients may have a role in inflammatory responses during disease flare-ups. Further research is warranted to confirm this hypothesis, and functional studies concerning neutrophils and endothelial cells are necessary to define the pro- or anti-inflammatory effects of sCD14 in the context of BD activity. This would define sCD14 as a potential therapeutic target in BD.

Disclosure statement: Neves FS, none; Carrasco S, none; Gonçalves CR, none; Lage LV, none; Goldenstein-Schainberg C, none; Mello SBV, none.

Acknowledgements: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Grant number 2007/52448-4].

REFERENCES

1. Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H (2004) Behçet syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 16:38-42.
2. Matsumara N, Mizushima Y (1975) Leucocyte movement and colchicine treatment in Behçet's disease. *Lancet* 2:813.
3. Takeno M, Kariyone A, Yamashita N *et al* (1995) Excessive function of peripheral blood neutrophils from patients with Behçet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. *Arthritis Rheum* 38:426-33.
4. Carletto A, Pacor ML, Biasi D *et al* (1997) Changes of neutrophil migration without modification of *in vitro* metabolism and adhesion in Behçet's disease. *J Rheumatol* 24:1332-6.
5. Mumcu G, Inanc N, Yavuz S, Direskeneli H (2007) The role of infectious agents in the pathogenesis, clinical manifestations and treatment strategies in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* (4 Suppl 45):S27-33.
6. Calguneri M, Kiraz S, Ertenli I, Benekli M, Karaarslan Y, Celik I (1996) The effect of prophylactic penicillin treatment on the course of arthritis episodes in patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 39:2062-5.

7. Direskeneli H, Eksioglu-Demiralp E, Yavuz S *et al* (2000) T cell responses to 60/65 kDa Heat Shock protein derived peptides in Turkish patients with Behçet's disease. *J Rheumatol* 27:708-13.
8. Medzhitov R, Hurlburt-Preston P, Janeway CA Jr (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signs activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-7.
9. Roelofs MF, Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LAB, van den Berg WB, Radstake TRDJ (2008) The orchestra of Toll-like receptor and their potential role in frequently occurring rheumatic conditions. *Arthritis Rheum* 58:338-48.
10. Do JE, Kwon SY, Park S, Lee ES (2008). Effects of vitamin D on expression of Toll-like receptors of monocytes from patients with Behçet's disease. *Rheumatology* 47:840-8.
11. Yavuz S, Elbir Y, Tulunay A, Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H (2008) Differential expression of toll-like receptor 6 on granulocytes and monocytes implicates the role of microorganisms in Behçet's disease etiopathogenesis. *Rheumatol Int* 28:401-6.
12. Sobel JD, Haim S, Obedeanu N, Meshulam T, Merzbach D (1977) Polymorphonuclear leukocyte function in Behçet's disease. *J Clin Pathol* 30:250-3.
13. Niwa Y, Mizushima Y (1990) Neutrophil-potentiating factors released from stimulated lymphocytes; special reference to the increased in neutrophil-potentiating factors from streptococcus-stimulated lymphocytes of patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 79:353-60.

14. Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V *et al* (1993) Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL-8 and increase neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *J Rheumatol* 20:1544-9.
15. Sahin S, Lawrence R, Direskeneli H, Hamuryudan V, Yazici H, Akoglu T (1996) Monocyte activity in Behçet's disease *Br J Rheumatol* 35:424-9.
16. Troelstra A, Giepmans BN, Van Kessel KP, Lichenstein HS, Verhoef J, Van Strijp JA (1997) Dual effects of soluble CD14 on LPS priming of neutrophils. *J Leukoc Biol* 61:173-8.
17. Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C (2004) CD14 is an acute-phase protein. *J Immunol* 172:4470-9.
18. International Study Group for Behçet's Disease (1991) Criteria for diagnosis of Behçet's Disease. *Lancet* 1991 335:1078-80.
19. Neves FS, Moraes JCB, Kowalski SC, Goldenstein-Schainberg C, Lage LV, Gonçalves CR (2007) Cross-cultural adaptation of the Behçet's Disease Current Activity Form (BDCAF) to Brazilian Portuguese language. *Clin Rheumatol* 26:1263-7.
20. Bhakta BB, Brennan P, James TE, Chamberlain MA, Noble BA, Silman AJ (1999) Behçet's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity *Rheumatology* 38:728-33.
21. Maliszewski CR (1991) CD14 and immune response to lipopolysaccharide. *Science* 252:1321-2.

22. Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS (1993) Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2744-8.
23. Soler-Rodriguez AM, Zhang H, Lichenstein HS *et al* (2000) Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *J Immunol* 164:2674-83.

Fig. 1 Increased concentration of soluble CD14 (sCD14) in serum: a) Behçet's disease (BD) patients (grey bar) vs. healthy controls (white bar). b) Active BD patients (grey bar) vs. inactive BD patients (white bar). Bars show means, error bars show $\pm$ standard error of means (* indicates $p < 0.05$).

Fig. 2 a) Positive correlation between soluble CD14 (sCD14) concentration in serum and membrane-bound CD14 (mCD14) expression on peripheral blood monocytes in Behçet's disease (BD) patients. b) Lack of correlation between sCD14 and IL-6 serum concentrations in BD patients (* indicates $p < 0.05$).

7.5. Anexo E

Regulamento editorial de *Clinical Rheumatology*¹

¹ Disponível na web: <http://www.springer.com/medicine/rheumatology/journal/10067> [acessado em 13/01/2009]

Clinical Rheumatology

Journal of the International League of Associations for Rheumatology

Editor-in-Chief: Paul Davis

ISSN: 0770-3198 (print version)

ISSN: 1434-9949 (electronic version)

Journal no. 10067

Springer London

Description

Clinical Rheumatology is an international English-language journal devoted to publishing original clinical investigation and research in the general field of rheumatology with accent on clinical aspects at postgraduate level. The journal succeeds *Acta Rheumatologica Belgica*, originally founded in 1945 as the official journal of the Belgian Rheumatology Society. Clinical Rheumatology aims to cover all modern trends in clinical and experimental research as well as the management and evaluation of diagnostic and treatment procedures connected with the inflammatory, immunologic, metabolic, genetic and degenerative soft and hard connective tissue diseases.

Impact Factor: 1.644 (2007)

Section "Rheumatology": Rank 15 of 21

Aims and scope

Clinical Rheumatology is an international journal devoted to publishing, in the English language, original clinical investigation and research in the general field of rheumatology with accent on clinical aspects at postgraduate level.

Studies carried out anywhere in the world will be considered, the basic criterion for acceptance being the medical and scientific standard of the work described. Manuscripts submitted for publication are scrutinised by independent expert assessors and once accepted will be published promptly.

Clinical Rheumatology succeeds *Acta Rheumatologica Belgica*, which was originally founded in 1945 as the official journal of the Belgian Rheumatology Society. Since the journal's international audience is concentrated in Eastern and Southern Europe, the Society has broadened the scope of the journal and adapted the editorial board and the title of the journal accordingly.

Rheumatology in Europe is not restricted to inflammatory rheumatic diseases but also includes non-surgical bone diseases, in general, and rehabilitation. The aim of the editorial board is for *Clinical Rheumatology* to reflect the field of rheumatology in its wider aspects. Hence, *Clinical Rheumatology* aims to cover all modern trends in clinical and experimental research as well as the management and evaluation of diagnostic and treatment procedures connected with the inflammatory, immunologic, metabolic, genetic and degenerative soft and hard connective tissue diseases.

Original publications, informative case reports, short communications, editorials, and reviews in relation to these topics will be accepted. Letters to the editor are welcome as enhancement to discussions. Articles in European languages other than English may be submitted but will be translated into English at the expense of the authors if accepted.

Case reports submitted and accepted after 1 August 2007 will be published electronically only, in a twice-yearly online supplement to the journal. The bibliographic data of the case reports will be published in the next printed issue of the journal after publication of the online supplement. The editor-in-chief may select exceptional case reports for inclusion in the print issue.

Types of papers

Original articles: word limit 4000 words, 45 references, no more than 6 figures/tables

Review articles: word limit 5000 words, 50 references, no more than 5 figures

Brief Report: word limit 2000 words, 25 references, no more than 4 figures

Case Reports: 1500 words, 1-2 figures/tables, 15 references

Case Reports submitted and accepted after 1 August 2007 will be published electronically only, in a twice-yearly online supplement to the journal. The bibliographic data of the case reports will be published in the next printed issue of the journal after publication of the online supplement. The editor-in-chief may select exceptional case reports for inclusion in the print issue.

Letters to editor: up to 600 words

Editorial

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 100 to 150 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.
 Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
 Save your file in doc format. Do not submit docx files.

[Word template](#)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. Doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. <http://www.rsc.org/dose/title> of subordinate document. Accessed 15 Jan 1999

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table heading. The table title should explain clearly and concisely the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table heading.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Line drawings should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the

different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc."

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm

wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted. The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. They should also state that they have full control of all primary data and that they agree to allow the journal to review their data if requested. Therefore the manuscript must be accompanied by the “Conflict of Interest Disclosure Form”. To download this form, please follow the hyperlink on the right.

Languages

Articles and abstracts must be in English or in the journal's official language(s), but the journal accepts additional abstracts in other languages of the author's choice (for instance in the author's first language, if not English or the journal's official language). Such abstracts are optional. Authors would need to supply such abstracts themselves, certify that they are a faithful translation of the official abstract, and they must be supplied in Unicode (see www.unicode.org for details), especially if they are using non-roman characters.

<http://www.unicode.org>

Such abstracts in other languages will carry a disclaimer:

"This abstract is provided by the author(s), and is for convenience of the users only. The author certifies that the translation faithfully represents the official version in the

language of the journal, which is the published Abstract of record and is the only Abstract to be used for reference and citation."

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

[Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Additional offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Copyright information

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in form of an abstract or as part of a published lecture, review or thesis); that it is not under consideration for publication elsewhere; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as - tacitly or explicitly - by the responsible authorities at the institution where the work was carried out. Transfer of copyright to Clinical Rheumatology becomes effective if and when the article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive right (for U.S. government employees: to the extent transferable) to reproduce and distribute the article, including reprints, translations, photographic reproductions, microform, electronic form (offline, online) or other reproductions of similar nature.

All articles published in this journal are protected by copyright, which covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article (e.g., as offprints), as well as all translation rights. No material published in this journal may be reproduced photographically or stored on microfilm, in electronic data bases, video disks, etc., without first obtaining written permission from the publisher. The use of general descriptive names, trade names, trademarks, etc., in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

An author may self-archive an author-created version of his/her article on his/her own website. He/she may also deposit this version on his/her institution's and funder's (funder designated) repository, including his/her final version, provided it is not made publicly available until after 12 months of official publication. He/she may not use the publisher's PDF version which is posted on www.springerlink.com for the purpose of self-archiving or deposit. Furthermore, the author may only post his/her version provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The original publication is available at www.springerlink.com".

Please use the appropriate DOI for the article (go to the Linking Options in the article, then to OpenURL and use the link with the DOI). Articles disseminated via SpringerLink are indexed, abstracted and referenced by many abstracting and information services, bibliographic networks, subscription agencies, library networks, and consortia.

The author warrants that this contribution is original and that he/she has full power to make this grant. The author signs for and accepts responsibility for releasing this material on behalf of any and all co-authors.

After submission of this agreement signed by the corresponding author, changes of authorship or in the order of the authors listed will not be accepted by Springer.

While the advice and information in this journal is believed to be true and accurate at the date of its publication, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The

publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Special regulations for photocopies in the USA. Photocopies may be made for personal or in-house use beyond the limitations stipulated under Section 107 or 108 of U.S. Copyright Law, provided a fee is paid. All fees should be paid to the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, Tel.:+1-978-7508400, Fax:+1-978-6468600, <http://www.copyright.com>, stating the ISSN 0770-3198, the volume, and the first and last page numbers of each article copied. The copyright owner's consent does not include copying for general distribution, promotion, new works, or resale. In these cases, specific written permission must first be obtained from the publisher.

The Canada Institute for Scientific and Technical Information (CISTI) provides a comprehensive, world-wide document delivery service for all Springer journals. For more information, or to place an order for a copyright-cleared Springer document, please contact Client Assistant, Document Delivery, CISTI, Ottawa K1A 0S2, Canada (Tel. +1-613-9939251, Fax +1-613-9528243, e-mail: cisti.docdel@nrc.ca).

Springer-Verlag London Limited is a part of
Springer Science+Business Media

springer.com

Ownership and Copyright
© Clinical Rheumatology

8. Referências

Aomatsu K, Kato T, Fujita H, Hato F, Oshitani N, Kamata N, Tamura T, Arakawa T, Kitagawa S. Toll-like receptor agonists stimulate human neutrophil migration via activation of mitogen-activated protein kinases. *Immunology*. 2008;123:171-80.

Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C. CD14 is an acute-phase protein. *J Immunol*. 2004;172:4470-9.

Ben-Ahmed M, Houman H, Miled M, Dellagi K, Louzir H. Involvement of chemokines and Th1 cytokines in the pathogenesis of mucocutaneous lesions of Behçet's disease. *Arthritis Rheum*. 2004;50:2291-5.

Bhakta BB, Brennan P, James TE, Chamberlain MA, Noble BA, Silman AJ. Behçet's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity. *Rheumatology*. 1999;38:728-33.

Calgüneri M, Kiraz S, Ertenli I, Benekli M, Karaarslan Y, Celik I. The effect of prophylactic penicillin treatment on the course of arthritis episodes in patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum*. 1996a;39:2062-5.

Calgüneri M, Ertenli I, Kiraz S, Erman M, Celik I. Effect of prophylactic benzathine penicillin on mucocutaneous symptoms of Behçet's disease. *Dermatology*. 1996b;192:125-8.

Carletto A, Pacor ML, Biasi D, Caramaschi P, Zeminian S, Bellavite P, Bambara LM. Changes of neutrophil migration without modification of *in vitro* metabolism and adhesion in Behçet's disease. *J Rheumatol.* 1997;24:1332-6.

Chappey O, Scherrmann JM. La colchicine: données récentes sur sa pharmacocinétique et sa pharmacologie clinique. *Rev Med Interne.* 1995;16:782-800.

Cheng TO. Some historical notes on Behçet's disease. *Chest.* 2001;119:667-8.

Courtney H, Ofek I, Simpson WA, Beachey EH. Characterization of lipoteichoic acid binding to polymorphonuclear leukocytes of human blood. *Infect Immun.* 1981;32:625-31.

Cuchacovich M, Merino G, Yamamoto JH, Villarroel F, Saavedra T, Jofre S, Gatica H, Velasquez V, Pizzo SV, Gonzalez-Gronow M. Behçet's disease patients present high levels of deglycosylated anti-lipoteichoic acid IgG and high IL-8 production after lipoteichoic acid stimulation. *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23(4 Suppl 38):S27-S34.

Direskeneli H. Autoimmunity vs autoinflammation in Behçet's disease: do we oversimplify a complex disorder? *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:1461-5.

Direskeneli H, Eksioglu-Demiralp E, Yavuz S, Ergun T, Shinnick T, Lehner T, Akoglu T. T cell responses to 60/65 kDa Heat Shock protein derived peptides in Turkish patients with Behçet's disease. *J Rheumatol.* 2000;27:708-13.

Diri E, Mat C, Hamuryudan V, Yurdakul S, Hizli N, Yazici H. Papulopustular skin lesions are seen more frequently in patients with Behçet's syndrome who have arthritis: a controlled and masked study. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:1074-6.

Do JE, Kwon SY, Park S, Lee ES. Effects of vitamin D on expression of Toll-like receptors of monocytes from patients with Behçet's disease. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47:840-8.

Erlich GE. Vasculitis in Behçet's disease. *Int Rev Immunol.* 1997;14:81-8.

Gür-Toy G, Lenk N, Yalcin B, Aksaray S, Alli N. Serum interleukin-8 as a serologic marker of activity in Behçet's disease. *Int J Dermatol.* 2005;44:657-60.

International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet.* 1991;335:1078-80.

Kaneko F, Oyama N, Yanagihori H, Isogai E, Yokota K, Oguma K. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behçet's disease. *Eur J Dermatol.* 2008;18:489-98.

Kawakami T, Ohashi S, Kawa Y, Takahama H, Ito M, Soma Y, Mizoguchi M. Elevated serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with active phase of Sweet syndrome and patients with active Behçet disease. *Arch Dermatol.* 2004;140:570-4.

Kirino Y, Takeno M, Watanabe R, Murakami S, Kobayashi M, Ideguchi H, Ihata A, Ohno S, Ueda A, Mizuki N, Ishigatsubo Y. Association of reduced heme oxygenase-1 with excessive Toll-like receptor 4 expression in peripheral blood mononuclear cells in Behçet's disease. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:R16

Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, Finberg RW. Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood*. 2002;100:1860-8.

Lehner T. Immunopathogenesis of Behçet's disease. *Ann Med Interne (Paris)*. 1999;150:483-4.

Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T. Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behcet's syndrome. *Infect Immun*. 1991;59:1434-41.

Lotz S, Aga E, Wilde I, van Zandbergen G, Hartung T, Solbach W, Laskay T. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leuk Biol*. 2004;75:467-77.

Matsumara N, Mizushima Y. Leucocyte movement and colchicine treatment in Behçet's disease. *Lancet*. 1975;2:813.

Maliszewski CR. CD14 and immune response to lipopolysaccharide. *Science*. 1991;252:1321-2.

Medzhitov R, Hurlburt-Preston P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signs activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394-7.

Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V, Gul A, Bongrand P, Roux H, Ocal L, Inanç M, Capo C. Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL-8 and increase neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *J Rheumatol*. 1993;20:1544-9.

Merino G, Fujino Y, Hanashiro RK. Lipoteichoic acid as an inducer of acute uveitis in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1251-6.

Mumcu G, Inanc N, Yavuz S, Direskeneli H. The role of infectious agents in the pathogenesis, clinical manifestations and treatment strategies in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2007; 25(4 Suppl 45):S27-33.

Nara K, Kurokawa MS, Chiba S, Yoshikawa H, Tsukikawa S, Matsuda T, Suzuki N. Involvement of innate immunity in the pathogenesis of intestinal Behçet's disease. *Clin Exp Immunol*. 2008;152:245-51.

Neves FS, Moraes JCB, Kowalski SC, Goldenstein-Schainberg C, Lage LV, Gonçalves CR. Cross-cultural adaptation of the Behçet's Disease Current Activity Form (BDCAF) to Brazilian Portuguese language. *Clin Rheumatol*. 2007;26:1263-7.

Niwa Y, Mizushima Y. Neutrophil-potentiating factors released from stimulated lymphocytes; special reference to the increased in neutrophil-potentiating factors from streptococcus-stimulated lymphocytes of patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol*. 1990;79:353-60.

Ohno S, Oguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M. Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. *Arch Ophthalmol*. 1982;100:1455-8.

Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:2744-8.

Roelofs MF, Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LAB, van den Berg WB, Radstake TRDJ. The orchestra of Toll-like receptor and their potential role in frequently occurring rheumatic conditions. *Arthritis Rheum*. 2008;58:338-48.

Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK, Whyte MKB. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol*. 2003;170:5268-75.

Sahin S, Lawrence R, Direskeneli H, Hamuryudan V, Yazici H, Akoglu T. Monocyte activity in Behçet's disease. *Br J Rheumatol*. 1996;35:424-9.

Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's disease. *N Engl J Med*. 1999;21:1284-91.

Stanford MR, Kasp E, Whiston R, Hasan A, Todryk S, Shinnick T. Heat shock proteins peptides reactive in patients with Behçet's disease are uveitogenic in Lewis rats. *Clin Exp Immunol.* 1994;97:226-31.

Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamman I, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR. Lipoteichoic Acid (LTA) of streptococcus pneumoniae and staphylococcus aureus activates immune cells via toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem.* 2003;278:15587-94.

Sobel JD, Haim S, Obedeanu N, Meshulam T, Merzbach D. Polymorphonuclear leukocyte function in Behçet's disease. *J Clin Pathol.* 1977;30:250-3.

Takeno M, Kariyone A, Yamashita N. Excessive function of peripheral blood neutrophils from patients with Behçet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. *Arthritis Rheum.* 1995;38:426-33.

Troelstra A, Giepmans BN, Van Kessel KP, Lichenstein HS, Verhoef J, Van Strijp JA. Dual effects of soluble CD14 on LPS priming of neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1997;61:173-8.

Tunc R, Keyman E, Melikoglu M, Fresko I, Yazici H. Target organ associations in Turkish patients with Behçet's disease: a cross sectional study by exploratory factor analysis. *J Rheumatol.* 2002;29:2393-6.

Tüzün B, Tüzün Y, Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H, Ozyazgan Y. Neutrophil chemotaxis in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 1999;58:658.

The Behçet's Disease Research Committee of Japan. Skin hypersensitivity to streptococcal antigens and the induction of systemic symptoms by the antigens in Behçet's disease – a multicenter study. *J Rheumatol*. 1989;16:506-1.

Wallace CR, Verity DH, Delamaine LJ. MICA allele profiles and HLA class I associations in Behçet's disease. *Immunogenetics*. 1999;49:613-7.

Yasuoka H, Okazaki Y, Kawakami Y, Hirakata M, Inoko H, Ikeda Y, Kuwana M. Autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes to major histocompatibility complex class I chain-related gene A in patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum*. 2004;50:3658-662.

Yavuz S, Elbir Y, Tulunay A, Eksioğlu-Demiralp E, Direskeneli. Differential expression of toll-like receptor 6 on granulocytes and monocytes implicates the role of microorganisms in Behçet's disease etiopathogenesis. *Rheumatol Int*. 2008;28:401-6.

Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H. Behçet syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2004;16:38-42.

Yurdakul S, Mat C, Tüzün Y, Ozyazgan Y, Hamuryudan V, Uysal O, Senocak M, Yazici H. A double-blind trial of colchicine in Behçet's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2001;44:2686-92.

Zouboulis CC. Epidemiology of Adamantiades-Behçet's disease. *Ann Med Interne (Paris)*. 1999;150:488-98.

Zouboulis CC, Keitel W. A historical review of early descriptions of Adamantiades-Behçet disease. *J Invest Dermatol*. 2002;119:201-5.