SOLANGE CARRASCO

**Aumento da expressão do receptor Toll-like 2 em
monócitos do sangue periférico de pacientes com
artrite psoriásica.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Médicas

Área de concentração:

Processos inflamatórios e alérgicos

Orientadora:

Dra. Cláudia Goldenstein-Schainberg

SÃO PAULO

2014

À minha família pelo carinho, compreensão e entusiasmo.
A Regina, pelo apoio e incentivo, fundamentais para a realização desta tese.
Aos meus amigos, que foram meu combustível no desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá, pelo estímulo e oportunidade de ingressar na pós-graduação.

À Dra. Cláudia Godenstein-Schainberg, pela orientação, dedicação e paciência na realização deste trabalho.

À Dra. Suzana Beatriz Verissimo de Mello, pela motivação para o ingresso na pós-graduação.

Aos Drs. Célio Roberto Gonçalves, Percival Degrava Sampaio Barros e Carla Gonçalves Schahin Saad, pela grande ajuda no recrutamento dos pacientes no Ambulatório de Espondiloartrites.

Ao Dr. Fabrício de Souza Neves, que me auxiliou na parte clínica, por sua amizade e dedicação sempre.

Às Dras. Waldenise Cossermelli, Sandra Gofinet Pasoto e Bernadete de Lourdes Liphaut, pelas valiosas sugestões e esclarecimentos na confecção desta tese.

Ao Dr. Francisco Garcia Soriano, pela valiosa colaboração na discussão.

À Marcela Helena Gambim Fonseca, que me auxiliou nas coletas de sangue e no laboratório, por sua amizade e convivência.

Em especial a Tatiana Vasconcelos, Isabelle Camargo e Natasha Ugriumov, por todo o auxílio no dia-a-dia e pelos momentos de descontração.

Ao Dr. Edwin Roger Parra Cuentas e ao Dr. Hermes Barbeiro, pelo grande auxílio na estatística.

A Lia Negrão, pela competência e preciosa ajuda na formatação deste trabalho.

Aos meus amigos da Reumatologia, pela amizade e carinho no decorrer destes 19 anos de convivência.

Aos pacientes do Ambulatório de Espondiloartrites, pela inestimável colaboração, pois sem eles não seria possível a execução desta tese.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVO	09
3 MÉTODO	11
3.1 Casuística	12
3.2 Obtenção do sangue periférico	12
3.3 Marcação do sangue periférico com anticorpos monoclonais CD14 (monócitos), CD66 (neutrófilos), CD114 (G-CSF), CD116 (GM-CSF), TLR-2 e TLR-4	13
3.4 Avaliação quantitativa de monócitos e neutrófilos do sangue periférico.....	15
3.5 Marcação do sangue periférico com anticorpo anti-HLA-B27 ligado à membrana do linfócito TCD3+	15
3.6 Citometria de fluxo.....	16
3.7 Análise estatística.....	18
4 RESULTADOS	19
4.1 Características demográficas dos pacientes com APs.....	20
4.2 Expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 ligados à membrana de monócitos e neutrófilos do sangue periférico com APS, APs ativa, APs inativa e controles	20
4.3 Expressão dos receptores CD114 e CD116 ligados à membrana de monócitos e neutrófilos do sangue periférico com APS, APs ativa, APs inativa e controles	25
4.4 Avaliação numérica de monócitos e neutrófilos do sangue de pacientes com APS, APs ativa, APs inativa e controles.....	26
4.5 Expressão do antígeno HLA-B27 ligado à membrana de linfócito	

TCD3+	27
4.6 Expressão do TLR-2 em monócitos de pacientes com APs HLA-B27+ comparados aos controles HLA-B27+	28
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÕES	35
7 ANEXOS	37
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
Apêndice	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo	Anticorpos monoclonais
ACR	“American College Rheumatology”
APs	Artrite Psoriásica
AS	“Ankylosing Spondylitis” (Espondilite anquilosante)
CASPAR	Critério para o diagnóstico de artrite psoriásica
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD	“Cluster of differentiation” (grupamento de diferenciação)
DAS 28	“Disease activity score” (Escore de atividade da doença)
Dot-plot	Gráfico de dispersão de pontos
EpA	“Espondiloartritis”
EA	Espondilite Anquilosante
EDTA	“Ethylenediamine tetra acetic acid” (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	“Fluorescence-activated cell sorting” (Separação de células ativadas por fluorescência)
FCS	“Fetal calf serum” (Soro fetal bovino)
FcR	“Fc Receptor” (Receptor Fc)

FSC	“Forward Scatter” (Fotodetector frontal do citômetro que evidencia o tamanho da célula)
FITC	“Fluorescein isothiocyanate” (Isotiocianato de fluoresceína - cor verde)
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	“Human Leukocyte Antigen” (Antígeno leucocitário humano ou antígeno de histocompatibilidade)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating fator (Fatores solúveis estimuladores de colônias de granulócitos)
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator (Fatores estimuladores de colônias de granulócitos-macrófagos)
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	“Lipoteichoic acid” (Ácido lipoteicóico)
mL	Mililitro
μL	Microlitro
PBS	“Phosphate buffered saline” (Solução salina em tampão fosfato)
PE	“Phycoerythrin” (Ficoeritrina - cor laranja)
PerCP-Cy5.5	“Peridin-chlorophyll proteins complex” (Complexo proteína peridina-clorofila)

PMN	Polimorfonucleares
PPRs	Pattern recognition receptors (Receptores de reconhecimento padrão)
PsO	Psoríase
RA	“Rheumatoid arthritis” (Artrite reumatoide)
rpm	Rotação por minuto
SpA	“Spondyloarthritis” (Espondiloartrite)
SSC	“Side scatter” (fotodetector lateral do citômetro, que evidencia a complexidade ou granulidade da célula)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR	“Toll-like receptor” (Receptor toll-like)
TNF-α	“Tumor necrosis factor alpha” (Fator de necrose tumoral alfa)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura representativa das marcações por citometria de fluxo.

Figura 2 – Gráfico da análise por citometria de fluxo dos monócitos e neutrófilos marcados com TLR-2 e TLR-4 de um paciente com artrite psoriásica.

Figura 3 – Gráfico da análise por citometria de fluxo dos monócitos e neutrófilos marcados com TLR-2 e TLR-4 de um controle.

Figura 4 – Gráfico da análise por citometria de fluxo do marcador genético HLA-B27 em um paciente com artrite psoriásica e controle.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Expressão do TLR-2 em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

Tabela 2 – Expressão do TLR-4 em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

Tabela 3 – Expressão do CD114 em monócitos e neutrófilos de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

Tabela 4 – Expressão do CD116 em monócitos e neutrófilos de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

Tabela 5 – Comparação quantitativa do número de monócitos e neutrófilos do sangue periférico, por citometria de fluxo, de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

RESUMO

CARRASCO, S. *Aumento da expressão do receptor Toll-like 2 em monócitos do sangue periférico de pacientes com artrite psoriásica* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo: 2014.

INTRODUÇÃO: Os receptores Toll-like 2 e 4 (TLR-2 e TLR-4) são capazes de ativar células imunes inatas em resposta a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Na artrite psoriásica (APs), doença articular inflamatória crônica, fatores genéticos, ambientais e infecciosos parecem estar envolvidos. **OBJETIVO:** Avaliar as expressões dos receptores: TLR-2; TLR-4; CD114 e do CD116 em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com APs e adicionalmente a prevalência do HLA-B27. **MÉTODOS:** Quarenta e cinco pacientes com diagnóstico de APs conforme os critérios CASPAR e 32 indivíduos saudáveis foram estudados. Dentre os 45 pacientes, 27 apresentavam APs ativa ($DAS28 \geq 2,6$) e 18 APs inativa ($DAS28 < 2,5$). A leitura das expressões do TLR-2, TLR-4, CD14, CD66, CD114, CD116 e do HLA-B27 foi realizada por citometria de fluxo no FACSCalibur da marca Becton-Dickson, utilizando anticorpos monoclonais da BD Biosciences, anti-humanos produzidos em murino. Os anticorpos monoclonais (AcMo) para marcar receptores de membrana empregados foram: CD14 conjugado com PerCP-Cy5.5 para marcar população de monócitos; CD66 conjugado com PE e FITC para população de neutrófilos; CD114 para marcar receptor de fator estimulatório de colônias de granulócitos e CD116 para marcar receptor de fator estimulatório de colônia de granulócitos-macrófagos. A análise estatística utilizou o teste U de Mann-Whitney e o teste exato de Fisher. Os valores obtidos em porcentagem foram expressos como média $\pm$ intervalo interquartil, de acordo com uma distribuição não-paramétrica, avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk. **RESULTADOS:** Demonstramos aumento de expressão do TLR-2 em monócitos periféricos de pacientes com APs, APs ativa e APs inativa comparados aos controles ($p < 0,002$; $p < 0,001$ e $p < 0,04$, respectivamente). A expressão do TLR-4 foi similar nos pacientes com APs, APs ativa e APs inativa e controles ($p < 0,23$; $p < 0,33$ e $p < 0,29$, respectivamente). A expressão do receptor G-CSF (CD114) e do receptor GM-CSF (CD116) foi similar nos pacientes e controles nas populações de monócitos e neutrófilos ($p > 0,05$). O HLA-B27 foi positivo em 1/3 dos pacientes com APs e 6% dos controles. Nos pacientes HLA-B27+ comparados aos controles HLA-B27+, a porcentagem de expressão do TLR-2 nos monócitos foi significativamente maior ($p < 0,004$). **CONCLUSÃO:** O aumento da expressão do TLR-2 em monócitos de pacientes com APs reforça o papel da imunidade inata e sugere que a exposição a bactérias Gram-positivas possa ter um papel na indução da resposta inflamatória nesta doença.

Palavras-chave

Artrite psoriásica, receptores Toll-like, imunidade inata, monócitos e neutrófilos, HLA-B27

ABSTRACT

CARRASCO, S. *Increased expression of Toll-like receptor 2 in peripheral blood monocytes from patients with psoriatic arthritis* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo: 2014.

INTRODUCTION: Toll-Like receptors 2 and 4 (TLR-2 and TLR-4) are able of activating innate immune cells in response to Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively. In Psoriatic Arthritis (APs), chronic inflammatory joint disease and genetic, environmental and infectious factors seems to be involved. **OBJECTIVES:** Evaluate expressions of TLR-2; TLR-4; CD114 and CD116 receptors in monocytes and neutrophils from peripheral blood patients with APs and additionally the prevalence of HLA-B27. **METHODS:** Forty five patients diagnosed with APs according with CASPAR criteria and 32 health individuals were studied. Among the 45 patients, 27 presented active APs (DAS28 $\geq$ 2,6) and 18 inactive APs (DAS28 < 2,5). The evaluation of the TLR-2, TLR-4, CD14, CD66, CD114, CD116 and HLA-B27 expressions was held by flow cytometry in FACSCalibur from Becton-Dickson, utilizing BD Biosciences' monoclonal antibodies, anti-human produced in mice. The monoclonal antibodies (AcMo) used to mark membrane receptors were: CD14 in conjunction with PerCP-Cy 5.5 to mark population of monocytes; CD66 in conjunction with PE and FITC for population of neutrophils; CD114 to mark stimulatory factor receptor for granulocyte colonies and CD116 to mark stimulatory factor receptor for granulocyte-macrophage colony. The statistical analysis utilized Mann-Whitney's U test and Fisher's exact test. The values obtained as percentages were expressed as median $\pm$ interquartile range, consistent with a non-parametrical distribution, assessed by Shapiro-Wilk's test. **RESULTS:** Increased expression of TLR-2 in peripheral monocytes of patients with APs, active APs and inactive APs compared to controls ($p < 0.002$; $p < 0.001$ and $p < 0.04$, respectively). TLR-4 expression was similar in patients with APs, active APs and inactive APs and controls ($p < 0.23$; $p < 0.33$ and $p < 0.029$ respectively). The expression of the G-CSF (CD114) receptor and GM-CSF (CD116) receptor were similar in patients and controls in populations of monocytes and neutrophils ($p > 0.05$). HLA-B27 was positive in 1/3 of the patients with APs and 6% of the controls. The percentage of expression of TLR-2 in HLA-B27 + patients compared to HLA-B27 + controls was significantly higher ($p < 0.004$). **CONCLUSION:** Increased of TLR-2 receptors expression in patients with APs monocytes reinforces the role of innate immunity and suggests that the exposure to Gram-positive bacteria may have a role in the induction of the inflammatory response in this disease.

Keywords

Psoriatic arthritis, toll-like receptors, innate immunity, neutrophils, monocytes, HLA-B27

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A artrite psoriásica (APs) é uma doença inflamatória crônica das articulações associada à psoríase cutânea, que pode acometer o esqueleto axial, com sacroilíte, além das articulações periféricas [1]. Louis Aliberti (1818), citado por Gladman (2009) [2], descreveu pela primeira vez a doença e, atualmente, estima-se que a sua prevalência na população mundial seja de 0,02%-0,025% [3]. A APs ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias [4], apesar de sua incidência ser maior dos 40 a 50 anos de idade [5]. A prevalência da psoríase cutânea isolada na população é de 2% a 3% e sua associação com artrite ocorre em 6% a 42% dos pacientes [1,6]. O envolvimento da pele precede a artrite em aproximadamente 75% dos casos, em 10% o quadro cutâneo e o articular são simultâneos e em 15% o comprometimento cutâneo é posterior [7]. De fato, as lesões eritemato-descamativas na pele podem preceder em meses ou anos a inflamação nas articulações, estruturas músculo-esqueléticas e partes moles adjacentes, com sintomas de dor, edema e rigidez, particularmente nos dedos das mãos e dos pés, sendo que o desencadeamento da APs pode ocorrer após estresse emocional [8, 9]. Em 1973, Moll e Wright propuseram a classificação da APs em 5 subgrupos ou formas clínicas distintas: a forma distal clássica, a oligoarticular assimétrica, a poliarticular semelhante à artrite reumatóide, a espondilitica e a mutilante [1]. No entanto, estudos posteriores mostraram superposição destas formas em boa parte dos pacientes, de modo que a tendência atual é classificar a APs em: poliarticular (41%), oligoarticular (31%), axial e periférica (28%) [10]. É importante ressaltar que o fator reumatoide sérico é ausente em todos os subgrupos [1]. O diagnóstico de APs é baseado nos critérios CASPAR (**Anexo A**), no qual é necessária a presença de doença inflamatória articular, seja ela periférica,

axial ou entesítica, e atingir pelo menos 3 pontos dentre 5 categorias: evidência de psoríase; distrofia ungueal psoriásica; fator reumatóide negativo; dactilite atual ou prévia; e evidência radiológica de neoformação óssea justa-articular [10].

A etiopatogenia da APs permanece desconhecida, mas acredita-se haver influência de fatores ambientais, infecciosos e imunogenéticos [9, 11].

O traço genético PSORS1-9 associado à APs favoreceu o conceito da base genética multifatorial, que se intensificou com a descoberta de mais de 20 *loci* candidatos associados à suscetibilidade para a expressão da doença [12,13,14]. De fato, vários *loci* de suscetibilidade envolvidos na APs tem sido implicados, principalmente os alelos do antígeno leucocitário humano (HLA - Human Leukocyte Antigen) de classe I, indicando ser uma doença geneticamente heterogênea [12]. O alelo HLA-Cw6 foi o mais associado, apesar de presente em 40% a 80% dos casos, mas também em 10% a 15% dos controles [13]. Pacientes HLA-Cw*0602+ iniciam a psoríase em idade mais jovem e têm doença de pele mais extensa e grave, enquanto que alterações ungueais e artrite são mais comuns nos pacientes HLA-Cw6- [12]. Polimorfismos nos genes codificados na região do cromossomo 6p igualmente foram associados à APs [15,16]. Outros marcadores como HLA-B13, HLA-B57, HLA-B39 e HLA-Cw7 também parecem ter associação positiva em estudos populacionais de psoríase e APs, embora mais forte com o HLA-Cw629 [17]. Alguns alelos parecem identificar um determinado padrão de APs, como o HLA-B27 com envolvimento axial, HLA-DR4 com forma erosiva e os HLA-DR7, HLA-B38 e HLA-B39 com poliartrite periférica [15]. Outros foram identificados como fator prognóstico, isto é, HLA-B39 isolado, HLA-B27 na presença de HLA-DR7 ou HLA-DQw3 na ausência de HLA-DR7, parecem conferir maior gravidade aos pacientes com APs, enquanto que o HLA-B22

parece ser protetor para progressão da doença [18]. Em relação ao HLA-B27, conforme a literatura mundial e de acordo com a região geográfica, pode estar presente em 20% a 60% dos doentes com APs [15,16], com maior incidência nas formas axiais ou espondilíticas [1,2]. Em nosso meio, 2 trabalhos analisaram a frequência do HLA-B27 em 22 e 102 pacientes brasileiros com APs [19,20]. No estudo de Belo Horizonte [19] o HLA-B27 foi positivo em 36% (8/22) pelo método de microlinfotoxidade, enquanto que no grupo de Campinas [20] sua positividade por PCR (polimerase chain reaction) foi de 21% (21/102), sobretudo nos espondilíticos.

Observações clínicas e laboratoriais sugerem o papel de agentes infecciosos na etiopatogenia da APs. Neste sentido, Vasey e colaboradores (1982) e Rantakokko e colaboradores (1997) encontraram, nos soros de pacientes com APs e psoríase, títulos elevados de anticorpos contra diferentes componentes da parede celular de estreptococos, incluindo peptidoglicanos e peptidoglicanos polissacárides, quando comparados àqueles com artrite reumatoide e controles saudáveis [21,22]. Esta resposta humoral específica notada sugere que bactérias da flora cutânea possam ser importantes no desencadeamento e/ou perpetuação da doença [21, 22].

Várias células, como fagócitos, incluindo neutrófilos e macrófagos, além de monócitos e células dendríticas, participam do reconhecimento de patógenos estimulando a resposta imunológica [23]. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra substâncias estranhas e infecciosas, como bactérias, por meio de barreiras físicas e químicas [23]. A ativação das células da imunidade inata ocorre por meio do reconhecimento de antígenos bacterianos via receptores Toll-like (TLRs) [24]. Os TLRs são glicoproteínas tipo I integrais de membrana; possuem um domínio homólogo ao receptor de IL-1 em sua cauda citoplasmática e um domínio

externo rico em leucina e cisteína, onde estão os receptores de reconhecimento padrão altamente conservados, os PRRs (pattern recognition receptors), responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune. Dez TLRs foram descritos em humanos e 13 em camundongos [25]. Os TLRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), sendo capazes de iniciar e perpetuar a resposta inflamatória. Os PAMPs abrangem diversos ligantes, como lipoproteína, lipopolissacáride (LPS), flagelinas e ácidos nucleicos de bactérias, vírus e parasitas, e os DAMPs incluem moléculas endógenas originadas de danos teciduais [26]. A ativação dos múltiplos TLRs gera a liberação das citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- β . Em indivíduos com predisposição genética, esta ativação desregulada pode levar à quebra da tolerância imunológica periférica e por sua vez o desenvolvimento de doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, esclerodermia sistêmica e APs [27, 28].

O TLR-2 é capaz de reconhecer vários padrões moleculares, como os peptidoglicanos, que são os principais constituintes da parede bacteriana de organismos Gram-positivos, enquanto que o TLR-4 reconhece os LPS, componentes básicos da parede das bactérias Gram-negativas [29, 30].

A molécula CD14 é um receptor importante no reconhecimento de ligantes microbianos, altamente expressa em monócitos circulantes, mas também em neutrófilos. Na membrana dos neutrófilos, a expressão do TLR-2 e do CD14 é regulada por fatores solúveis estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF- Granulocyte colony-stimulating factor – receptor CD114) e por fatores estimuladores de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF- Granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor – receptor CD116) [31]. O G-CSF é gerado em locais de infecção e atua como um hormônio endócrino capaz de mobilizar os neutrófilos da medula e repô-los, caso sejam consumidos na reação inflamatória; também funciona como co-receptor juntamente com o TLR-4 para ligação ao LPS bacteriano. Por outro lado, o GM-CSF promove a maturação de células da medula óssea, originando células dendríticas e monócitos [23]; sensibilizam estas células a responderem de forma exacerbada à estimulação subsequente com agonistas do TLR-2 [31]. É importante ressaltar que ambos – o TLR-2 e o TLR-4 – ativam monócitos e neutrófilos a produzirem citocinas pró-inflamatórias envolvidas em doenças inflamatórias crônicas [28,30].

Na psoríase, há maior proliferação de queratinócitos, infiltrado de células inflamatórias e angiogênese aumentada, que podem anteceder a ocorrência da manifestação articular, ou seja, da APs [32]. A nível tecidual, e por imunohistoquímica, demonstrou-se aumento de expressão do TLR-2 na epiderme; na derme, células dendríticas expressaram TLR-2 e TLR-4, mas não TLR-9, enquanto que células dendríticas da epiderme expressaram TLR-4, mas não TLR-2 nem TLR-9 (32). Já nas células mononucleares do sangue periférico, Garcia-Rodriguez e colaboradores (2011) demonstraram aumento importante da expressão gênica do TLR-4 e aumento moderado da expressão gênica do TLR-2, enfatizando o envolvimento da resposta imune inata nesta doença [33]. Begon E. e colaboradores (2007) [34] haviam estudado a expressão de TLRs 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em pacientes com psoríase e observaram que apenas a expressão do TLR-2 estava aumentada em lesões cutâneas e em células obtidas de cultura de queratinócitos estimulados com peptidoglicanos e LPS [30]. Alguns autores argumentam que os queratinócitos

possam ser a chave do processo inflamatório que, após estímulo, liberam citocinas pró-inflamatórias [35], como TNF- α e IL-8 [30], promovendo o recrutamento de células T [35]. Assim, na psoríase, um estímulo infeccioso ou ambiental poderia atuar como gatilho, interferindo na imunidade inata, levando à ativação de queratinócitos e sinoviócitos [32] com liberação de IL-1 e TNF- α ativando as células dendríticas da epiderme e da derme [32]. Estas células ativadas processam o antígeno e migram para os linfonodos, promovendo o recrutamento de células inflamatórias como células T e B para o tecido lesado. Assim, os linfócitos T ativados de doentes psorásicos se diferenciariam preferencialmente em células TCD4+ tipo 1 (Th1; produtores de INF- γ , TNF- α e IL-2), tipo 17 (Th17; produtores de IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-22) e TCD8+ tipo 1 (Tc1; produtores de TNF- α , INF- γ , perforinas e granzima B) [36]. Portanto, estas citocinas pró-inflamatórias juntamente com o aumento da angiogênese auxiliariam o recrutamento dos linfócitos, perpetuando o processo inflamatório.

Em pacientes com APs, apenas um estudo analisou o possível papel etiopatogênico dos TLRs. Candia e colaboradores (37) avaliaram a expressão do TLR-2 e do TLR-4 em monócitos do sangue periférico de 10 indivíduos com APs ativa, artrite reumatoide e controles por citometria de fluxo e Western Blot. Os monócitos foram estimulados *in vitro* com GM-CSF concomitante com IL-4 e LPS, no intuito de promover sua diferenciação em células dendríticas imaturas e em células dendríticas maduras, respectivamente. Os autores observaram expressão aumentada do TLR-2 nas células dendríticas imaturas de pacientes com doença ativa, mas não naqueles com artrite reumatoide e controles normais. No sobrenadante de cultura de monócitos notaram aumento de produção de TNF- α e IFN- γ , sugerindo um padrão Th1 de resposta, mas não de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 nem IL-12 [37].

Portanto, parece que, na psoríase e na APs, o aumento da expressão do TLR-2, aliado à maior produção de citocinas pró-inflamatórias, sugere o papel da imunidade inata na patogênese da doença psoriásica, onde bactérias Gram-positivas poderiam atuar como gatilho para o seu desenvolvimento. Entretanto e diante da escassez de estudos consistentes que esclareçam a participação da imunidade inata na APs, conduzimos este estudo. Desta forma, no intuito de investigar esta hipótese, avaliamos a expressão do TLR-2 e do TLR-4 em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de um maior número de pacientes com APs, comparando doentes com doença ativa e inativa. Adicionalmente, verificamos as expressões dos receptores de G-CSF (CD114) e GM-CSF (CD116) e a prevalência do antígeno HLA-B27 em amostra de pacientes brasileiros com APs pertencentes a um único centro.

.

OBJETIVOS

2. Objetivos

- Estudar em monócitos e em neutrófilos do sangue periférico de pacientes com APs, e considerando a influência da atividade clínica da doença, a expressão dos receptores:
 - TLR-2 e TLR-4.
 - G-CSF (CD114) e GM-CSF (CD116).

 - Determinar a prevalência do antígeno HLA-B27 em uma grande amostra de pacientes brasileiros com APs pertencentes a um único centro.
-

MÉTODOS

3. Métodos

3.1. Casuística

Durante o período de 24 meses, pacientes consecutivos com diagnóstico definido de APs acompanhados no ambulatório de espondiloartrites (EpA) da Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) foram estudados. Todos os sujeitos preencheram os critérios CASPAR (**Anexo A**) [10]. Foram incluídos pacientes com doença periférica e excluídos aqueles com doença axial isolada e/ou com intercorrências infecciosas. O grupo controle foi formado por voluntários saudáveis do Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia (LIM-17) do HCFMUSP. Este estudo baseou-se nos princípios da Declaração de Helsinki, recebendo aprovação do Comitê de Ética institucional (CAPPesq nº 0533/07) e todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (**Apêndice**) antes do início do estudo.

Como o quadro clínico era sobretudo periférico, o escore de atividade de doença DAS28 (**Anexo B**) foi utilizado para avaliar a atividade clínica da APs. Este se baseia na contagem de 28 articulações dolorosas e edemaciadas, na velocidade de hemossedimentação (VHS) e na avaliação global de saúde (AGS), e considera pacientes com doença clinicamente ativa aqueles com $DAS\ 28 \geq 2,6$ [40].

3.2. Obtenção de sangue periférico

Amostras de 5 mL de sangue foram coletados de todos pacientes com APs e controles por punção venosa periférica em tubos com EDTA, para posterior marcação com anticorpos monoclonais apropriados.

3.3. Marcação do sangue periférico com anticorpos monoclonais

Após coleta do sangue periférico, 200 μ L de sangue de pacientes com APs e controles foram colocados em cada 1 dos 6 tubos contendo 2 mL de tampão fosfato salina com azida 0,1% phosphate buffered saline (PBS); em seguida à centrifugação a 2.000 rpm por 3 minutos, 50 μ L de PBS-azida 0,1% com soro fetal bovino 2% (SFB) foram adicionados. Quatro dos 6 tubos foram centrifugados e incubados durante 20 minutos com o receptor Fc anti-humano não-conjugado (reagente de bloqueio FcR, eBioscience, San Diego, CA, EUA) para evitar a subsequente aderência não-específica de anticorpos monoclonais (AcMo).

Seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), as células do sangue periférico distribuídas nos 6 tubos foram coradas por 20 minutos com os seguintes anticorpos monoclonais anti-humanos produzidos em murinos: a) anti-CD66 conjugado com ficoeritrina (PE - amarelo) e com isotiocianato de fluoresceína (FITC - verde) para marcação específica de neutrófilos; b) anti-CD14 conjugado com complexo proteína peridina-clorofila (PerCP-Cy5. 5 - vermelho forte) para marcação de monócitos; c) anti-TLR-2 conjugado com Alexa-fluor®; d) anti-TLR-4 biotinilado conjugado com estreptavidina marcada com isotiocianato de fluoresceína -FITC; e) anti-CD114 conjugado com PE para marcação de receptor G-CSF (fator estimulatório de colônias de granulócitos); f) anti-CD116 conjugado com FITC como marcador de receptor GM-CSF (fatores estimulatórios de colônias de granulócitos-macrófagos).

As compensações do citômetro de fluxo antes de cada análise foram realizadas utilizando marcação com anticorpos isotípicos para cada fluorocromo (FL-1, FL-2 e FL-3) como controle negativo. Para o controle positivo, as células sanguíneas foram marcadas em um único tubo com anti-TCD3 (PerCP) FL-3, anti-TCD4 (PE) FL-2 e anti-TCD8 (FITC) FL-1 (**Figura 1**).

Figura 1. Figura representativa das marcações de citometria de fluxo.

TLR-2 e TLR-4 = Toll like-receptors, CD66 = neutrófilos, CD14= monócitos
 CD116 = GM-CSF (Fatores estimulatórios de colônias de granulócitos-macrófagos)
 CD114 = G-CSF (Fator estimulatório de colônias de granulócitos), TCD3 = Linfócitos

Após marcação com os monoclonais e para melhor visualização das células brancas, os eritrócitos de cada tubo foram lisados com 2 mL de solução de lise diluída em água destilada na concentração de 1:10 (BD Biosciences) por no máximo 10 minutos e centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos. Em seguida, as células brancas marcadas foram lavadas 2 vezes com 2 mL de solução de PBS-azida 0,1% e fixadas em 400 µL de paraformaldeído a 1% para posterior análise citométrica.

Todos os tubos foram armazenados a 4°C por pelo menos 15 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur™, sendo que 30.000 células (monócitos e neutrófilos) de cada amostra foram avaliadas.

3.4. Avaliação quantitativa de monócitos e neutrófilos do sangue periférico

A avaliação quantitativa de monócitos e de neutrófilos foi feita por citometria de fluxo, após marcação sanguínea com os anticorpos murinos anti-CD14 conjugado com PerCP-Cy5.5 (vermelho forte) e anti-CD66 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-verde), respectivamente. Duas regiões foram determinadas no gráfico *dot-plot* considerando o número total das populações de monócitos e de neutrófilos, respectivamente.

3.5. Marcação do sangue periférico com anticorpo anti-HLA-B27 ligado à membrana do linfócito TCD3+

Uma aliquota de 50 µL de sangue periférico de cada paciente com APs e controle foi utilizada para detectar o HLA-B27. Após incubação com 30 µL do anticorpo anti-TCD3/PE e anti-HLA-B27/FITC, o tubo de ensaio foi homogeneizado por 3 segundos e incubado durante 15 a 20 minutos à temperatura ambiente. Dois mL de solução de lise BD FACS foram adicionados e realizada nova incubação por no máximo 10 minutos, seguida de centrifugação a 1.200 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante aspirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur acoplada à bomba a vácuo foi descartado. O tubo contendo as células marcadas foi agitado em baixa velocidade, 2 mL de PBS com 0,1% de azida sódica foram adicionados e seguidos de nova agitação à baixa velocidade. Após centrifugação a

1.200 rpm por 5 minutos, o sedimento homogeneizado foi fixado com 250 μ L de paraformaldeído a 1% por no mínimo 30 minutos para posterior análise citométrica.

3.6. Citometria de Fluxo

Todas as análises das células do sangue periférico marcadas com os monoclonais foram realizadas por citometria de fluxo. Esta metodologia avalia as múltiplas propriedades físicas e biológicas de uma célula, como seus antígenos de membrana, componentes intracitoplasmáticos e nucleares (Marti e colaboradores, 2001 [39]; Bacal e colaboradores, 2003 [40]). Para a análise das regiões de polimorfonucleares (PMN), de monócitos, do fator estimulatório de colônias de granulócitos (CD114), do fator estimulatório de granulócitos-macrófagos (CD116) e dos TLR-2 e TLR-4, as regiões foram avaliadas no gráfico de dispersão frontal e lateral, no qual se visualiza o tamanho e a granulidade de cada célula. Em cada região, PMN e monócitos foram definidos como células CD66+ ou CD14+, respectivamente. A porcentagem de células que expressam TLR-2 ou TLR-4 foi contada, sendo consideradas como positivas as células situadas no quadrante superior direito. Os limites de positividade para *dot-plots* no gráfico foram definidos usando anticorpos monoclonais (isotiocianato de fluoresceína – FITC; ficoeritrina PE e complexo proteína peridínina-clorofila PerCP) como controles isotípicos.

Todos os reagentes foram utilizados à temperatura ambiente, protegidos da luz direta, e todas as amostras foram analisadas no aparelho FACSCalibur Analyser Becton Dickinson. Os ajustes iniciais nas voltagens dos fotomultiplicadores dos detectores de dispersão da luz frontal (FSC) e lateral (SSC) foram realizados com os controles isotípicos. Em seguida, com os controles positivos (TCD3+, TCD4+ e TCD8+), foram realizadas as compensações dos fotodetectores de fluorescência-1

(FL-1), fluorescência-2 (FL-2) e fluorescência-3 (FL-3), capazes de detectar comprimentos de onda de 494 nm e 517 nm emitidos pelo fluorocromo FITC (verde), de 565 nm e 660 nm emitidos pelo fluorocromo PE (amarelo), de 670 nm emitidos pelo PerCp (vermelho) e de 488 nm emitidos pelo Alexa Fluor® (verde), respectivamente. Estes ajustes são necessários para corrigir a superposição dos espectros de fluorescência emitidos por FITC, PE, PerCp e Alexa Fluor®. As células mononucleares foram aspiradas pelo sistema fluido e individualmente excitadas pelo feixe de raios laser. À medida que as células foram excitadas pelo laser, elas absorveram a energia do laser e a emitiram em forma de comprimento de ondas (fluorescências). As ondas de energia ou sinais de luz passavam pelo sistema óptico constituído de espelhos e filtros de luz e eram conduzidos para os fotodetectores FL-1, FL-2 e FL-3. Concomitantemente, o detector FSC captava a luz dispersa na direção frontal do laser, que corresponde ao tamanho da célula. O detector SSC, situado em ângulo reto com o laser, captava a luz dispersa lateralmente, reflexo de complexidade interna das células e de sua granulidade. Todos os sinais ópticos foram amplificados e transformados em sinais eletrônicos, convertidos em valores digitais, quantificados e enviados para análise digital no computador do citômetro de fluxo [39,40,41], utilizando o programa CellQuest™ (BD Biosciences).

Para análise do HLA-B27, a leitura no citometro de fluxo foi feita usando o software BD™ HLA-B27 e a região dos linfócitos foi avaliada no gráfico de dispersão frontal e lateral, na qual se visualiza o tamanho e a granulidade de cada célula nas células TCD3+. Em seguida, a porcentagem de células que expressam TCD3+/HLA-B27+ foi visualizada, sendo consideradas como positivas as células no quadrante

superior direito. Os limites de positividade para *dot-plots* no gráfico foram definidos usando controles isotípicos.

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa Windows® SPSS 15,0 para pacote de software estatístico (Chicago, IL, EUA). A comparação entre grupos utilizando o teste U de Mann-Whitney e os resultados expressos em porcentagem como média $\pm$ intervalo interquartil, de acordo com uma distribuição não-paramétrica, avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk. Na análise do HLA-B27 entre os grupos positivos e negativos, utilizamos o software GraphPad Prism 6.0 pelo teste de Fisher.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Características demográficas dos pacientes com APs

Quarenta e cinco pacientes com APs, 22 mulheres e 23 homens, com média de idade de 52 ± 13 anos e duração média da doença de 15 ± 10 anos e 32 indivíduos saudáveis, 17 mulheres e 15 homens, com média de idade 33 ± 7 anos incluídos como grupo controle foram analisados. Vinte e sete pacientes foram classificados como tendo APs ativa (média do DAS28 $> 3,75$), duração média da doença de 14 ± 9 anos e 18 pacientes como APs inativa (média do DAS28 $< 1,76$) com duração medida da doença 17 ± 11 anos ($p>0,91$).

4.2. Expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 ligados à membrana de monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles (Tabelas 1 e 2, Figuras 2 e 3)

A **Tabela 1** mostra a expressão do TLR-2 em monócitos e em neutrófilos de pacientes com APs e controles. Nos monócitos, a expressão do TLR2 nos pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e indivíduos sadios foi $89 \pm 17\%$; $90 \pm 17\%$; $86 \pm 18\%$ e $71 \pm 49\%$, respectivamente, sendo maior nos pacientes com APs, tanto com doença ativa como naqueles com APs inativa quando comparados aos controles ($p=0,002$, $p=0,001$ e $p=0,004$). Ainda, a expressão do TLR-2 nos monócitos foi similar nos pacientes com APs ativa e APs inativa ($90 \pm 17\%$ vs $86 \pm 18\%$, $p=0,10$). Em neutrófilos, a expressão do TLR-2 foi similar nos pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e indivíduos sadios: $6 \pm 29\%$; $6 \pm 39\%$; $8 \pm 24\%$ e $18,50 \pm 31\%$, respectivamente ($p=0,07$, $p=0,15$ e $p=0,10$). Não houve diferença na expressão do

TLR-2 em neutrófilos de pacientes com APs ativa comparados aos com APs inativa ($6 \pm 9\%$ vs. $8 \pm 24\%$, $p=0.74$).

Em relação à expressão do TLR-4, a **Tabela 2** demonstra que foi similar em ambos – monócitos e neutrófilos – de pacientes com APs e controles, tanto nos com APs ativa, quanto nos com APs inativa.

Tabela 1. Expressão do TLR-2 em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

TLR-2		
	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)
APs vs controles	89 ± 17 vs 71 ± 49 $p=0,002^*$	6 ± 29 vs 18 ± 31 $p=0,07$
APs ativa vs controle	90 ± 17 vs 71 ± 49 $p= 0,001^*$	6 ± 39 vs 18 ± 31 $p=0,15$
APs inativa vs controle	86 ± 18 vs 71 ± 49 $p= 0,04^*$	8 ± 24 vs $18,50 \pm 31$ $p=0,10$
APs ativa vs APs inativa	90 ± 17 vs 86 ± 18 $p=0,10$	5 ± 39 vs 8 ± 24 $p=0,74$

APs: Artrite psoriásica.

*Teste U de Mann-Whitney, $p<0.05$.

Tabela 2. Expressão do TLR-4 em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

TLR-4		
	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)
APs vs controles	2 ± 9 vs 1 ± 3 $p=0,23$	2 ± 9 vs 1 ± 3 $p=0,48$
APs ativa vs controle	2 ± 4 vs 1 ± 3 $p=0,33$	2 ± 7 vs 1 ± 3 $p=0,69$
APs inativa vs controle	2 ± 15 vs 1 ± 3 $p=0,29$	2 ± 11 vs 1 ± 3 $p=0,42$
APs ativa vs APs inativa	2 ± 4 vs 2 ± 15 $p=0,83$	2 ± 7 vs 2 ± 11 $p=0,66$

APs: Artrite psoriásica.

*Teste U de Mann-Whitney, $p<0.05$.

Por meio de *dot-plot* e histograma, as **Figuras 2 e 3** representam, respectivamente, as leituras das expressões do TLR-2 e do TLR-4 na membrana de monócitos e neutrófilos de 1 paciente com APs e 1 controle.

Figura 2. Citometria de fluxo de um paciente com artrite psoriásica: a) gráfico de dispersão dos leucócitos periféricos de acordo com tamanho e granulosidade; b) definição dos quadrantes (limites de positividade) de acordo com distribuição de monócitos incubados com controle isotípico; c) definição de quadrantes (limites de positividade) de acordo com distribuição de neutrófilos incubados com controle isotípico; d) expressão de TLR-2 (eixo horizontal) e de CD14 (eixo vertical) por monócitos; e) expressão de TLR-2 (eixo horizontal) e de CD66 (eixo vertical) por neutrófilos; f) a expressão de TLR-4 (eixo horizontal) e CD14 (eixo vertical) por monócitos; g) a expressão de TLR-4 (eixo horizontal) e CD66 (eixo vertical) por neutrófilos. A porcentagem de células (monócitos ou neutrófilos) no quadrante superior direito foi considerada como uma medida da expressão TLR.

Figura 3. Citometria de fluxo de um controle: a) gráfico de dispersão dos leucócitos periféricos de acordo com tamanho e granulosidade; b) definição dos quadrantes (limites de positividade) de acordo com distribuição de monócitos incubados com controle isotípico; c) definição de quadrantes (limites de positividade) de acordo com distribuição de neutrófilos incubados com controle isotípico; d) expressão de TLR-2 (eixo horizontal) e de CD14 (eixo vertical) por monócitos; e) expressão de TLR-2 (eixo horizontal) e de CD66 (eixo vertical) por neutrófilos; f) a expressão de TLR-4 (eixo horizontal) e CD14 (eixo vertical) por monócitos; g) a expressão de TLR-4 (eixo horizontal) e CD66 (eixo vertical) por neutrófilos. A porcentagem de células (monócitos ou neutrófilos) no quadrante superior direito foi considerada como uma medida da expressão TLR.

4.3. Expressão dos receptores CD114 e CD116 ligados à membrana de monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles (Tabelas 3 e 4)

A expressão do CD114 (G-CSF) em monócitos e neutrófilos foi semelhante em pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles, conforme mostrado na **Tabela 3**. Da mesma forma, a expressão do CD116 (GM-CSF) também foi similar nos pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles (**Tabela 4**).

Tabela 3. Expressão do CD114 em monócitos e neutrófilos de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

CD114	Monócitos (%)	<i>p</i>	Neutrófilos (%)	<i>p</i>
APs vs controles	67±18 vs 51±24	0,06	95±19 vs 93±20	0,74
APs ativa vs controles	71±13 vs 51±24	0,09	90±28 vs 93±20	0,99
APs inativa vs controles	64±22 vs 51±24	0,13	99±1 vs 93±20	0,62
APs ativa vs APs inativa	71±13 vs 64±22	0,73	90±28 vs 99±1	0,70

APs: Artrite psoriásica.

*Teste U de Mann-Whitney, $p < 0.05$.

Tabela 4. Expressão do CD116 em monócitos e neutrófilos de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

CD116	Monócitos (%)	p	Neutrófilos (%)	p
APs vs controle	32±20 vs 48±30	0,25	79±25 vs 81±17	0,25
APs ativa vs controles	33±39 vs 48±30	0,27	77±17 vs 81±17	0,25
APs inativa vs controles	37±29 vs 48±30	0,35	81±17 vs 81±17	0,23
APs ativa vs APs inativa	33±39 vs 37±29	0,95	77±17 vs 81±17	0,25

APs: Artrite psoriásica.

*Teste U de Mann-Whitney, $p < 0.05$.

4.4. Avaliação numérica de monócitos e neutrófilos no sangue periférico de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles (Tabela 5)

Por meio da citometria de fluxo, a contagem de monócitos de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e indivíduos sadios foi de 999 ± 437 ; 1.043 ± 506 ; 934 ± 310 e 656 ± 402 , respectivamente, sendo estatisticamente maior nos pacientes com APs, tanto com doença ativa como naqueles com APs inativa, quando comparados aos controles ($p < 0,01$). Da mesma forma, os números absolutos de neutrófilos também foram significativamente maiores nos pacientes com APs, tanto APs ativa quanto APs inativa, quando comparados aos controles (15.271 ± 5.162 ; 15.898 ± 5.149 e 14.329 ± 5.180 ; 9.417 ± 5.789) $p < 0,001$. A contagem de monócitos e neutrófilos entre os pacientes com APs ativa comparados a APs inativa foram similares (1.043 ± 506 ; 934 ± 310 e 15.898 ± 5.149 ; 14.329 ± 5.180) $p > 0,96$ e $p > 0,39$, respectivamente.

Tabela 5. Comparação quantitativa do número de monócitos e neutrófilos do sangue periférico, por citometria de fluxo, de pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles.

APs	Monócitos (n)	Neutrófilos (n)
APs vs controles n=45/32	999 ± 437 vs 657 ± 402 $p < 0,0003^*$	15271 ± 5162 vs 9417 ± 5789 $p < 0,0001^*$
APs ativa vs inativa n=27/18	1043 ± 506 vs 934 ± 310 $p = 0,96$	15898 ± 5149 vs 14329 ± 5180 $p = 0,39$
APs ativo vs controles n=27/32	1043 ± 506 vs 656 ± 402 $p < 0,0008^*$	15898 ± 5149 vs 9417 ± 5789 $p < 0,0001^*$
APs inativos vs controles n=18/32	934 ± 310 vs 656 ± 402 $p < 0,01^*$	14329 ± 5180 vs 9417 ± 5789 $p < 0,0001^*$

APs: Artrite psoriásica.

*Teste Mann-Whitney U, $p < 0.05$

4.5. Expressão do antígeno HLA-B27 ligado à membrana de linfócitos TCD3+ (Figura 4)

Dentre os 45 pacientes que participaram deste estudo, o teste para analisar a expressão do HLA-B27 foi feito em 37, estando presente em 12 (32%), sendo que 3(25%) e 9(75%) tinham acometimento da doença (periférica e axial + periférica respectivamente. Na amostra de 32 controles, a positividade foi de 2/32 (6%) ($p < 0,01$).

Além destes 45 pacientes, a expressão do HLA-B27 foi realizada em outros 104 sujeitos com APs pertencentes ao nosso serviço de reumatologia do HCFMUSP, sendo positivo em 30, ou seja 29%. Desta forma, a positividade total do HLA-B27 dentre os 141 pacientes com APs foi de 29,8%. De acordo com os subtipos clínicos de doença entre estes 141 pacientes, o HLA-B27 foi positivo em 26% (22/85) dos pacientes com APs periférica, 37% (17/46) dos pacientes com doença axial e periférica e 30% (3/10) daqueles com envolvimento axial isolado.

Na **Figura 4**, observa-se dados citométricos representativos da expressão do HLA-B27 em 1 controle e em 1 paciente com APs, respectivamente.

Figura 4. Citometria de fluxo de um controle e de um paciente com artrite psoriásica: a) gráfico de dispersão dos leucócitos periféricos de acordo com tamanho e granulosidade; b) definição dos quadrantes (limites de positividade), de acordo com distribuição de linfócitos incubados com controle isotópico; c) expressão do anticorpo HLA-B27 no eixo horizontal e CD3 no eixo vertical; d) expressão de CD3/HLA-B27 representada por histograma. A porcentagem de células CD3/HLA-B27 no quadrante superior direito foi considerada como uma medida da expressão do HLA-B27.

4.6. Expressão do TLR-2 em monócitos de pacientes com APs HLA-B27+ comparados aos controles HLA-B27+

Nos pacientes com APs HLA-B27+ comparados aos controles HLA-B27+, a porcentagem de expressão do TLR-2 nos monócitos foi significativamente maior ($p < 0,004$).

DISCUSSÃO

5. Discussão

Este estudo demonstrou pela primeira vez aumento da expressão do TLR-2 em monócitos de pacientes com APs, independentemente da atividade da doença, sugerindo associação preferencial com bactérias Gram-positivas. De maneira similar, a expressão do TLR-2 também foi maior nos pacientes com APs HLA-B27+, reforçando a importância destes receptores na ativação do sistema imune inato.

Nos monócitos dos pacientes com APs, APs ativa e APs inativa, a expressão do TLR-2 foi significativamente maior quando comparados aos controles. Entre pacientes com APs ativa e APs inativa não houve diferença significativa, sugerindo que o aumento da expressão do TLR-2 é independente da atividade da doença. Em neutrófilos, a expressão do TLR-2 foi similar nos pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e indivíduos saudáveis. Uma possibilidade para explicar esta discrepância dos achados de expressão do TLR-2 nos monócitos e neutrófilos talvez seja o tamanho da amostra. Não houve diferença na expressão do TLR-2 em neutrófilos de pacientes com APs ativa comparados aos pacientes com APs inativa. Neste sentido, recentes pesquisas apontam para o potencial papel dos TLRs em uma variedade de doenças inflamatórias (lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose sistêmica, gota e outras) [28, 30, 42, 43]. A detecção do TLR-2 nos pacientes com APs indica que houve estimulação da resposta imunológica inata, provavelmente ativada no início da doença e desencadeada por ácidos lipoteicóicos presentes na parede de bactérias Gram-positivas.

Corroborando com estes achados, Candia e colaboradores (2007) relataram que a expressão do TLR-2 foi significativamente elevada em células dendríticas

imaturas obtidas a partir de culturas de monócitos de pacientes com APs ativa estimulados com GM-CSF e IL-4, sugerindo que bactérias Gram-positivas desencadeiam a alta expressão do TLR-2, contribuindo para o processo imunopatogênico envolvido na doença articular relacionada à psoríase [37]. Entretanto, Candia e colaboradores não encontraram diferença de expressão do TLR-2 nos monócitos circulantes, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes avaliados (n= 10) [37]. Em psoríase na qual o envolvimento da pele precede a artrite em até 75% dos casos [7], alguns autores relataram alta expressão de TLR-2 na pele destes pacientes, sugerindo que bactérias Gram-positivas, tais como estreptococos, podem ter um papel indutor relevante na doença [21, 22].

Histologicamente, a APs é caracterizada por infiltração de linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas associado com aumento da proliferação de neutrófilos e angiogênese [52]. Os neutrófilos tem papel importante no desenvolvimento da placa psoriásica participando da angiogênese [47,44]. Toichi e colaboradores (2000) [45] relataram nas placas psoriásicas e no sangue periférico redução do número de neutrófilos após administração de ticlopidina (antiagregante plaquetário) com aparecimento de novas placas e aumento na contagem dos neutrófilos quando a medicação foi suspensa. Além do envolvimento dos neutrófilos, estudos clínicos e experimentais indicam que a inflamação mediada por monócitos-macrófagos é um fator-chave na estimulação de queratinócitos e hiperproliferação de sinoviócitos [citado pelo 31]. Embora indivíduos normais expressem constitutivamente TLR-2 em queratinócitos epidérmicos, estudos em psoríase mostraram que as lesões psoriásicas na pele têm expressão aumentada deste receptor em comparação com a

pele normal [47], enquanto que não foi observada diferença na expressão do TLR-3 e TLR-4 [34,47].

Em relação à expressão do TLR-4, a porcentagem foi similar em ambos – monócitos e neutrófilos – de pacientes com APs e controles, tanto nos com APs ativa, quanto nos com APs inativa, sugerindo que bactérias Gram-negativas não devam participar na patogênese da APs. Entretanto, Garcia e colaboradores (2011), em PsO, evidenciaram o aumento na expressão do gene TLR-4 em células mononucleares do sangue periférico, porém não avaliaram a expressão do TLR-4 na membrana [33]. Em células dendríticas de pacientes com doença psoriásica, os TLR-2 e os TLR-4 estavam aumentados [34] e em outras formas de espondiloartrites, como a espondilite anquilosante (EA), ambos foram altamente expressos em monócitos do sangue periférico [48]. Interessantemente, a artrite reativa é claramente desencadeada por uma infecção gastrointestinal bacteriana por *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter* e *Shigella*, ou urogenital (*Chlamydia trachomatis*) [49], bactérias Gram-negativas que contenham em suas paredes LPS que são reconhecidos pelos TLR-4.

A expressão do CD114 (receptor de G-CSF) em monócitos e neutrófilos foi semelhante em pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles. Da mesma forma, a expressão do CD116 (receptor de GM-CSF) também foi similar nos pacientes com APs, APs ativa, APs inativa e controles. Monócitos e neutrófilos desempenham um importante papel na resposta inflamatória por meio da produção de moléculas específicas envolvidas na resposta imune [31]. A produção e a liberação de G-CSF são estimuladas por LPS presente em bactérias Gram-negativas [53]. LPS e G-CSF funcionam como estímulo primário na ativação de neutrófilos por meio da sua interação com TLR-2 e com o receptor CD114, respectivamente, promovendo a

produção e liberação de GM-CSF. Estudos *in vitro* mostram que monócitos são ativados por TRL-2, mas a presença de GM-CSF aumenta a resposta de monócitos e neutrófilos [53]. Quando ocorre a ligação do G-CSF ao receptor CD114, há uma diminuição dos receptores disponíveis, uma vez que esse complexo proteína-receptor é internalizado e degradado [54], sendo uma possível explicação para nossos resultados. Possivelmente, os G-CSF e GM-CSF solúveis estão sendo liberados nos monócitos e neutrófilos ativados, estimulando a medula óssea a produzir precursores de monócitos e neutrófilos. Futuramente, dosagens dos fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF solúveis talvez possam ajudar a esclarecer nossos achados.

O número total de monócitos e neutrófilos foi significativamente maior nos pacientes com APs comparados aos nossos controles. Estudos clínicos e experimentais indicam que a inflamação mediada por monócitos-macrófagos é um fator-chave na estimulação de queratinócitos e hiperproliferação de sinoviócitos [citado pelo 31]. Toichi e colaboradores (2000) observaram que os neutrófilos estão aumentados nas placas psoriásicas e no sangue periférico [45], corroborando com nossos achados e enfatizando o envolvimento da imunidade inata na APs com a participação de monócitos e neutrófilos.

Dentre os 37 pacientes que analisamos, a expressão do HLA-B27 foi positiva em 12 (32%), sendo que 3 (25%) e 9 (75%) tinham acometimento da doença (periférica e axial + periférica, respectivamente). Como o quadro clínico era sobretudo periférico e com a intenção de diferenciar o índice de atividade da doença, utilizamos o escore de atividade de doença DAS28, excluindo os pacientes com envolvimento puramente axial. A frequência de HLA-B27+ em nosso estudo foi similar à literatura mundial (20% a 60%) [1] e na população brasileira (20,6% a 36,4%) [19,20]. A

importância da associação do HLA-B27 e bactérias foi demonstrada em modelo murino transgênico HLA-B27+, em que o estado livre de germe impede o desenvolvimento de características de EpA [48]. Propõe-se que os produtos microbianos sejam apresentados para linfócitos TCD8+ no contexto do HLA-B27+ por células apresentadoras de antígeno, iniciando assim a resposta inflamatória em humanos [49]. Adicionalmente, a expressão do TLR-2 foi maior nos monócitos de pacientes HLA-B27+ em comparação com indivíduos saudáveis HLA-B27+, indicando o possível papel destes receptores na patogênese da APs. Em AR, o HLA-B27 está associado com o aumento da invasão de *Salmonella* nas células epiteliais [55], sugerindo que o HLA-B27 é fortemente associado à infecção [6]. Em murinos com AR, fagócitos mononucleares foram responsáveis pela disseminação extraintestinal de *Salmonella* [56] e fibroblastos podem servir como reservatório para micróbios [57].

Em conclusão, a alta expressão do TLR-2 em monócitos de pacientes com APs sugere o papel de micro-organismos Gram-positivos como um gatilho na resposta inflamatória nesta doença. Estudos posteriores são necessários para esclarecer o significado patológico da estimulação do TLR na APs.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- 1) Pela primeira vez demonstramos aumento da expressão do TLR-2 em monócitos de pacientes com APs, reforçando o papel do sistema imune inato e a possível participação de bactérias Gram-positivas na patogênese da APs.
 - 2) O aumento da expressão do TLR-2 em monócitos de pacientes com APs ativa e inativa sugere que esta seja uma característica da própria doença independente da sua atividade clínica.
 - 3) A expressão de TLR-4 em monócitos e neutrófilos similar em pacientes com APs e controles sugere que bactérias Gram-negativas não devam participar na patogênese da doença.
 - 4) Expressão similar do CD114 e do CD116 (receptores de G-CSF e GM-CSF, respectivamente) entre pacientes com APs e controles normais.
 - 5) Aumento de expressão de TLR-2 em monócitos de pacientes com APs HLA-B27+ sugere importante papel destes receptores na patogênese da APs, assim como também da imunidade inata.
 - 6) A prevalência de HLA-B27 nos nossos pacientes com APs é semelhante ao descrito na literatura mundial e brasileira.
-

ANEXOS

7. Anexos

Anexo A – CASPAR criteria

The CASPAR criteria^{*}

To meet the CASPAR (CIAssification criteria for Psoriatic ARthritis) criteria, a patient must have inflammatory articular disease (joint, spine, or enthesal) with ≥ 3 points from the following 5 categories:

1. Evidence of current psoriasis, a personal history of psoriasis, or a family history of psoriasis.

Current psoriasis is defined as psoriatic skin or scalp disease present today as judged by a rheumatologist or dermatologist.[†]

A personal history of psoriasis is defined as a history of psoriasis that may be obtained from a patient, family physician, dermatologist, rheumatologist, or other qualified health care provider.

A family history of psoriasis is defined as a history of psoriasis in a first- or second-degree relative according to patient report.

2. Typical psoriatic nail dystrophy including onycholysis, pitting, and hyperkeratosis observed on current physical examination.

3. A negative test result for the presence of rheumatoid factor by any method except latex but preferably by enzyme-linked immunosorbent assay or nephelometry, according to the local laboratory reference range.

4. Either current dactylitis, defined as swelling of an entire digit, or a history of dactylitis recorded by a rheumatologist.

5. Radiographic evidence of juxtaarticular new bone formation, appearing as ill-defined ossification near joint margins (but excluding osteophyte formation) on plain radiographs of the hand or foot.

^{*}The CASPAR criteria have specificity of 98.7% and sensitivity of 91.4%.

[†]Current psoriasis is assigned a score of 2; all other features are assigned a score of 1.

Taylor W, Gladman D, Helliwell P, et al. *Arthritis Rheum* 2006;54:2665-73

**Anexo B – Figura representativa da contagem de 28 articulações
(DAS 28)**

Prevoo Mll, Van't Hoff MA *et al. J Rheumatol* 1997;24:1477-85.

REFERÊNCIAS

8. Referências

1. MOLL JM, WHIGHT V. PSORIATIC ATHRITIS. **Seimin Arthrithis Rheumatol.** 1973;3:55-78.
 2. DAFNA D GLADMAN. Psoriatic arthritis. **Dermatologia therapy.** 2009; vol.22:40-55.
 3. ALAMANOS Y, VOULGARI PV, DROSOS AA. Incidence and prevalence of psoriatic arthritis: a systematic review. **J Rheumatol.** 2008;Jul;35(7):1354-8. Epub 2008 May 1.
 4. WILSON FC, ICEN M, CROWSON CS, MCEVOY MT, GABRIEL SE, KREMERS HM. Time trends in epidemiology and characteristics of psoriatic arthritis over 3 decades: a population-based study. **J Rheumatol.** 2009;Feb;36(2):361-7.
 5. TRONTZAS T, ANDRIANA KOS A, MIYAKIS S, *et al.* Seronegative spondyloarthropaties in Greece: a population-based study of prevalence, clinical pattern and management. The ESORDIG study. **Clin Rheumatol.** 2005; 24(6):583-9.
 6. GLADMAN DD, ANTONI C, MEASE P, CLEGG DO, NASH P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. **Ann Rheum Dis.** 2005; Mar;64 Suppl 2:ii14-7.
 7. ESPINOZA LR, CUELLAR ML: Psoriatic arthritis and spondylitis: a clinical approach. In Calin A, Taurog JD (editors). Spondyloarthritis. Oxford: **Oxford University Press**, 1998:97-111.
-

8. GOLDENSTEIN-SCHAINBERG C., FAVARATO MMS, RANZA R., Conceitos atuais e relevantes sobre artrite psoriásica. **Rev. Bras Reumatol.** 2012;52(1):92-106.
 9. GOLDENSTEIN-SCHAINBERG C, SAAD CGS, GONÇALVES CR. Espondiloartrites. (In: Shinko SK). **Reumatologia.** São Paulo:Editora Atheneu, 2010; p. 137-53.
 10. TAYLOR W, GLADMAN D, HELLIWELL P, MARCHESONI A, MEASE P, MIELANTS H; CASPAR STUDY GROUP: Classification criteria for psoriatic arthritis: development of a new criteria from a large international study. **Arthritis Rheum.** 2006; 54: 2665-73.
 11. LIMA FR, GONÇALVES CR, GOLDENSTEIN-SCHAINBERG C. ESPONDILOARTROPATIAS. IN: YOSHINARI NH, BONFÁ ED (orgs). **Reumatologia para o clínico.** São Paulo: Roca, 2000; p. 111-22.
 12. BOWCOCK AM, COOKSON WO. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatites. **Hum Mol Genet.** 2004; 13:R43-55.
 13. DUFFIN KC, CHANDRAN V, GLADMAN DD, KRUEGER GG, ELDER JT, RAHMAN P. Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis: Update and future direction. **J Rheumat.** 2008; 35:1449-53.
 14. NAIR RP, DUFFIN KC, HELMS C, DING J, STUART PE, GOLDFAR D *et al.* Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. **Nat Genet.** 2009; 41:199-204.
-

15. GLADMAN DD, ANHORN KA, SCHACHTER RK, MERVART H. HLA antigens in psoriatic arthritis. **J Rheumatol**. 1986 Jun; 13(3):586-92.
 16. GONZALEZ S, MARTINEZ-BORRA J, TORRE-ALONSO JC, GONZALEZ-ROCES S, SANCHEZ DEL RÍO J, RODRIGUEZ PÉREZ A, BRAUTBAR C, LÓPEZ-LARREA C. The MICA-A9 triplet repeat polyformphism in the trans membrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis. **Arthritis Rheum**. 1999; May;42(5):1010-6.
 17. HO PY, BARTON A, WORTHINGTON J, Plant D, Griffiths CE, Young HS, Bradburn P, Thomson W, Silman AJ, Bruce IN. Investigating the role of the HLA-Cw*06 and HLA-DRB1 genes in susceptibility to psoriatic arthritis: comparison with psoriasis and undifferentiated inflammatory arthritis. **Ann Rheum Dis**. 2008; May;67(5):677-82. Epub 2007 Aug 29.
 18. GLADMAN DD, FAREWELL VT, KOPCIUK KA, COOK RJ. HLA markers and progression in psoriatic arthritis. **J Rheumatol**. 1998; Apr;25(4):730-3.
 19. BOMTEMPO CAS, LAGE RC, FERREIRA GAM, CARVALHO AP. Avaliação clínica, laboral e radiográfica de brasileiros com espondiloartropatias. **Rev Bras Reumatol**. v6; n4, p.238-245, jul/ago 2006.
 20. BONFIGLIOLI R, CONDE A R, SAMPAIO-BARROS PD, LOUZADA-JUNIOR P, DONADI A E, BERTOLO BM. Frequency of HLA-B27 alleles in Brazilian patients with psoriatic arthritis. **Clin Rheumat** . 2008; 27:709-712.
-

21. VASEY FB, DEITZ C, FENSKE NA, GERMAIN BF, ESPINOZA LR: Possible involvement of group A streptococci in the pathogenesis of psoriatic arthritis. **J Rheumatol.** 1982; 9: 719-22.
 22. RANTAKOKKO K, RIMPILÄINEN M, UKSILA J, JANSÈN C, LUUKKAINEN R, TOIVANEN P: Antibodies to streptococcal cell wall in psoriatic arthritis and cutaneous psoriasis. **Clin Exp Rheumatol.** 1997; 15: 399-404.
 23. ABBAS A K., LICHTMAN AH and PILLAI SHIV. **Imunologia celular e molecular.** 7ª edição Elsevier 2011.
 24. 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.
 25. KIYOSHI TAKEDA and SHIZUO AKIRA. Toll-like receptors in innate immunity. **International immunology.** 2005; vol 17, n1, p1-14.
 26. KEOGH B, ANDREW E, PARKE A.E. Toll-like receptors as targets for immune disorders. **Trens in Pharmacological Sciences.** 2011; july; vol.32, n°7.
 27. 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.
 28. QING LIN, MINGCAI LI *et al.* The essential roles of toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. **International Immunopharmacology.** 11 (2011) 1422-1432.
-

29. TADEUCHI O, HOSHINO K, KAWAI T, *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**. 1999; 11: 443-51.
 30. SANTEGOETS, KCM., VAN BON, L. *et al.* Toll-like receptors in rheumatic diseases: Are we paying a high price for our defense against bugs. **FEBS Letters** 585 (2011) 3660-3666.
 31. EVELYN A., KURT-JONES, LEISA MANDELL, CONSTANCE WHITNEY, ALISON PADGETT, KERRI GOSSELIN *et al.* 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 vol.100, n.5;1860-
 32. BOS, JD, DE RIE, MA, TEUNISSEM, MBM, PISKIN, G.. Psoriasis: dysregulation of innate immunity. **British journal of Dermatology**. 2005; 152, pp1098-1107.
 33. GARCIA-RODRIGUES, S. ARIAS-SANTIAGO, *et al.* Increased gene expression of Toll-Like receptor 4 on peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriasis. **JEADV** (Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology):2011.1-9.
 34. BEGON E, MICHEL L, BEATRICE F *et al.*: Expression, subcellular localization and cytokine modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. **Eur J Dermatol**. 2007; 17: 497-506.
 35. PAUKKONEN K, NAUKKARINEN A, HORSMANHEIMO M. The development of manifest psoriatic lesions is linked with the appearance of ICAM-1 positivity on keratinocytes. **Arch Dermatol Res**. 1995; 287(2):165-70.
-

36. FITCH E, HARPER E, SKORCHEVA I, KURTZ SE, BLAUVEIT A. Pathophysiology of psoriasis: recente advances on IL-23 and TH17 cytokines. **Curr Rheumatol Rep.** 2007; 9:461-7.
 37. CANDIA L, MARQUEZ J, HERNANDEZ C, ZEA AH, ESPINOZA LR: Toll-like receptor-2 expression is upregulated in antigen-presenting cells from patients with psoriatic arthritis: a pathogenic role for innate immunity? **J Rheumatol.** 2007; 34: 364-9.
 38. PREVOO MLL, VAN'T HOFF MA, KUPER HH, VAN LEEUWEN MA, VAN DE PUTTE LBA, VAN RIEL PLCM: Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective and longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** 1995; 38: 44-8.
 39. MARTI GE, STELER-STEVENSON M, BLEESING JJH, FLEISHER TA. Introduction to Flow Cytometry. **Sem Hematol.** 2001;38(2):93-9.
 40. BACAL NS, FAULHABER MHW. Introdução a citometria de fluxo. In: **Aplicação prática em citometria de fluxo.** São Paulo, Editora Atheneu, 2003. Cap1, p1-4.
 41. PEREIRA J. **Estudo de células precursoras em leucemias agudas: Identificação e fator de prognóstico das proteínas BCL-2, Bax e CD95?Fas/APO-1.** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.
 42. IWAHASHI M, YAMAMURA M, AITA T *et al.*: Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. **ArthritisRheum.** 2002; 46: 298-308.
-

43. YAVUZ S, ELBIR Y, TULUNAY A, EKŞIOĞLUDEMİRALP E, DİRESKENELİ H: 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.
 44. CHIMENTI, MS, BALLANTI, E., PERRICONE, C., CIRPIANI, P., GIACOMELLI, R., PERRICONE, R. Immunomodulation in psoriatic arthritis: Focus on cellular and molecular pathways. **Autoimmunity reviews.** 2013 v12, 599-606.
 45. TOICHI E, TACHIBANA T, FURUKAWA F. Rapid improvement of psoriasis vulgaris during drug-induced agranulocytosis. **J. Am. Acad Dermatol.** 2000 Aug;43 (2 Pt 1):391-5.
 46. KRUIHOF, E., BAETEN, D., DE RYCKE, L. *et al.* Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthropathy more than it does rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, vol7 n3, 2005.
 47. BAKER, BS, OVIGNE, JM, POWLES, AV, CORCORAN, S, FRY, L: Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. **Br J Dermatol.** 2003; 148: 670-9.
 48. DE RYCKE L, VANDOOREN B, KRUIHOF E, DE KEYSER F, VEYS EM, BAETEN D: Tumor necrosis factor α blockade treatment down modulates the increased systemic and local expression of Toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 in spondylarthropathy. **Arthritis Rheum.** 2005; 52: 2146-58.
 49. EKMAN P, KIRVESKARI J, GRANFORS K: Modification of disease outcome in Salmonella-infected patients by HLA-B27. **Arthritis Rheum.** 2000; 43: 1527-34.
-

50. TAUROG JD, RICHARDSON JA, CROFT JT *et al.*: The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. **J Exp Med.** 1994; 180: 2359-64.
 51. BAETEN D, DE KEYSER F, VEYS E, MIELANTS H: Immune linkages between inflammatory bowel disease and spondyloarthropathies. **Curr Opin Rheumatol.** 2002; 14: 342-7.
 52. DE KEYSER F, ELEWAUT D, DE VOS M *et al.*: Bowel inflammation and the spondyloarthropathies. **Rheum Dis Clin North Am.** 1998; 24: 785-813.
 53. GOMES, FR. **Expressão do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli*.** [Tese] apresentada pelo Instituto Butantã. São Paulo 2010.
 54. WELTE, K., GABRILOVE, J., BRONCHUD, MH, PLATZER, E., MARSTYN, G. Filgrastin (r-metHuG-CSF): The first 10 years. **Blood.** 1996 v.88, n6 pp1907-1929.
 55. VASQUEZ-TORRES A, JONES-CARSON J, BÄUMLER AJ, FALKOW S, VALDIVIA R, BROWN W, *et al.* Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD-18-expressing phagocytes. **Nature.** 1999;401:804-8.
 56. HÄUPL T, HAHN G, RITTIG M, KRAUSE A, SCHOERNER C, SCHÖNHERR U, *et al.* Persistence of *Borrelia burgdorferi* in ligamentous tissue from a patient with chronic Lyme borreliosis. **Arthritis Rheum.** 1993;36:1621-6.
-

APÊNDICE

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 01/08/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0533/07**, intitulado: **"EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE (TOLL-LIKE RECEPTORS) 2 E 4 EM MONÓCITOS E GRANULÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REATIVA E ARTRITE PSORIÁSICA"** apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o 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: **Cláudia Goldenstein Schainberg**

Pesquisador (a) Executante: **Fabricio de Souza Neves**

CAPPesq, 07 de Agosto de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br - fe

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Clínica Médica

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 30.08.11 tomou conhecimento que o **Protocolo de Pesquisa nº 0533/07** - intitulado "**EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE (TOLL-LIKE RECEPTORES) 2 E 4 EM MONÓCITOS E GRANULÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REATIVA E ARTRITE PSORIÁSICA**", que tem como pesquisadora responsável a Profa. Dra. Cláudia Goldenstein Schainberg, será dissertação de mestrado da aluna **SOLANGE CARRASCO**, tendo como orientadora a **PROFA. DRA. SUZANA BEATRIZ VERÍSSIMO DE MELLO**.

CAPPesq, 30 de agosto de 2011.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE (TOLL-LIKE RECEPTORS) 2 E 4 EM MONÓCITOS E GRANULÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REATIVA E ARTRITE PSORIÁSICA**

PESQUISADOR: Dra. Cândia Goldenstein Schainberg.....

CARGO/FUNÇÃO: ..Médica..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52963.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Reumatologia.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO **X**

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : ...2 anos.....

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa

A Artrite Reativa (ARe) e Artrite Psoriásica (APs) são doenças articulares inflamatórias crônicas que fazem parte do grupo das Espondiloartropatias e compartilham características comuns, como associação com o HLA B27. O papel de agentes infecciosos como fator desencadeante nestas doenças tem sido especulado. Enquanto que relação entre bactérias Gram-negativas entéricas é comum na ARe, o envolvimento infeccioso nas demais entidades do grupo não é claramente estabelecido. Na APs, é possível que bactérias Gram-positivas, colonizadoras de lesões cutâneas, participem da sua patogenia. Os Receptores Toll-like (*Toll-like Receptors*, TLR) foram recentemente descritos como capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos e ativar a resposta imune inata, de modo que o TLR-2 reconhece germes Gram-positivos enquanto que o TLR-4 reconhece Gram-negativos. Portanto, avaliaremos neste estudo a expressão de TLR-2 e TLR-4 em monócitos e granulócitos de pacientes portadores de ARe e APs.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

No dia de sua consulta normal no ambulatório de Reumatologia você será entrevistado pelo médico pesquisador, que fará perguntas a respeito dos sintomas e sinais que podem ocorrer na Artrite reativa e na Artrite Psoriásica.

Uma pequena quantidade (2 ml) de sangue será retirado da veia do braço, com uma agulha fina, da mesma maneira como é normalmente colhido sangue para seus exames de controle habituais. Esse sangue será levado pelo médico pesquisador ao laboratório, onde as células do sangue serão separadas e, usando um aparelho chamado Citômetro, será possível contar células com receptores "Toll" circulantes no seu sangue.

Os exames de sangue e urina serão solicitados e colhidos no laboratório do Hospital das Clínicas da mesma maneira que nas consultas habituais.

3. Desconfortos e riscos esperados

O desconforto/risco desta pesquisa é representado pelos seguintes fatores:

- Ter que ir para o hospital para a consulta médica;
- Ter de responder ao questionário sobre a doença (duração estimada de dez minutos);
- Colher sangue para os testes. Para colher sangue é puncionada uma veia com agulha, por isso pode ser sentida uma leve dor no local ou a formação de uma equimose ("roxo"), que desaparece em pouco tempo;
- Passar pelo Laboratório Central do HC para coleta de sangue para exames de rotina;

4. Benefícios que poderão ser obtidos

Esclarecemos que a participação neste estudo não trará nenhum benefício direto. Não será cobrado nem será fornecida remuneração em dinheiro ou outra vantagem financeira pela participação neste estudo.

Contudo, os resultados deste estudo, podem, em longo prazo, oferecer vantagens para as pessoas com Artrites, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado.

Seu tratamento não será modificado pelos pesquisadores, pois você continuará sendo acompanhado pelo médico que normalmente o assiste, o qual acompanhará os trabalhos deste estudo.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Terá a oportunidade, se desejar, de marcar outras consultas com a equipe para esclarecimento de eventuais dúvidas ou questões a discutir, refletir e pensar junto ao profissional responsável pela pesquisa.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Você poderá ter acesso, quando desejar, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

2. Você continua livre para retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

3. As informações pessoais obtidas nas entrevistas não serão divulgadas em público, sendo assegurada a salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

4. Fica assegurado a você a disponibilidade de assistência no HCFMUSP através do Serviço/Disciplina de Reumatologia, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. No cumprimento do item anterior, não cabe indenização.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Fabrcio de Souza Neves, médico, Pós-Graduando em Ciências Médicas da FMUSP, registrado no Conselho Federal de Medicina de São Paulo sob o numero 113.771; enderço à Av. Dr. Altino Arantes 742, ap 84, São Paulo – SP, fone 8243-7584.

Pode ser também contactado no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas:
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, CEP 05403-900 - SP - Brasil
Telefone : (11) 3069-6384 (ambulatório)

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Você será mantido informado sobre os resultados parciais da pesquisa sempre que assim o desejar e solicitar, bem como será informado sobre outros conhecimentos que possam influenciar na minha decisão de continuar na pesquisa.

Em seus comparecimentos, você receberá se assim desejar um atestado médico comprovando sua participação no estudo.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2011 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Toll-like receptor (TLR) 2 is upregulated on peripheral blood monocytes of patients with psoriatic arthritis: a role for a gram-positive inflammatory trigger?

S. Carrasco, F.S. Neves, M.H. Fonseca, C.R. Gonçalves, C.G. Saad, P.D. Sampaio-Barros, C. Goldenstein-Schainberg

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

Abstract

Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are able to activate innate immune cells in response to gram-positive and gram-negative bacteria, respectively. Psoriatic arthritis (PsA) is a chronic inflammatory joint disease and gram-positive streptococcus may have a role in its pathogenesis, suggesting the importance of TLR2 stimulation in PsA.

Objective

To assess TLR2 and TLR4 expressions on innate immune cells of PsA patients, relating to clinical disease activity.

Methods

Forty-five patients with peripheral joint manifestations of PsA were included and disease activity was assessed by Disease Activity Score of 28 joint counts (DAS28). 32 healthy subjects constituted the control group. Membrane-bound TLR2 and TLR4 expressions were assessed on peripheral blood monocytes and neutrophils by flow cytometry.

Results

Twenty-seven patients had active PsA (DAS28 higher than 2.6) and 18 had inactive disease. TLR2 was significantly upregulated on monocytes in both active and inactive PsA group, comparing to healthy controls. TLR4 was similarly expressed in all tested groups.

Conclusion

TLR2 is overexpressed by PsA monocytes, suggesting that gram-positive exposure could induce higher inflammatory responses in this disease.

Key words

psoriatic arthritis, toll-like receptors, innate immunity, monocytes, neutrophils

Toll-like receptor 2 in psoriatic arthritis / S. Carrasco et al.

Solange Carrasco, BSc
 Fabricio S. Neves, MD, PhD
 Marcela H. Fonseca, PhD
 Clio R. Gonalves, MD, PhD
 Carla G. Saad, MD
 Percival D. Sampaio-Barros, MD, PhD
 Cludia Goldenstein-Schainberg, MD, PhD

Please address correspondence to:

Dr Fabricio Souza Neves,
 Reumatologia,
 Faculdade de Medicina da
 Universidade de So Paulo,
 Av. Dr. Arnaldo, 455, 3 andar, sala 3133,
 Pacaembu, So Paulo,
 SP, CEP 01246-903, Brazil.
 E-mail: nevesfs@gmail.com

Reprints will not be available from the author.

Received on February 28, 2011; accepted in revised form on May 20, 2011.

 Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2011.

Introduction

Spondyloarthritis (SpA) are a group of chronic inflammatory diseases characterised by axial and peripheral arthritis and enthesitis in close association with HLA-B27 (1). Its pathogenesis remains largely unclear, but an important clue is provided by the relation of environmental triggers and genetic background. In reactive arthritis, a subtype of SpA, chronic disease is clearly triggered by a precedent gastrointestinal or urogenital bacterial infection (2), and germ-free state prevents the development of SpA features in the HLA-B27 transgenic rat model (3). It is proposed that microbial products are presented to CD8+ lymphocytes in the context of HLA-B27+ antigen-presenting cells, initiating the inflammatory response (4).

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) (5). TLR2 and TLR4 are extracellular receptors that recognise, respectively, gram-positive and gram-negative bacterial lipid-based structures (lipoteichoic acid and lipopolysaccharide, in that order) (6). Toll-like receptor activation on monocytes and neutrophils ultimately results in cellular activation and production of several stimulating cytokines (7, 8), which would contribute to the development and maintenance of the pro-inflammatory background of some chronic inflammatory diseases.

Psoriatic arthritis (PsA) is a subtype of SpA and there is subtle evidence of its link to gram-positive bacteria exposure. Vasey *et al.* proposed that, if some bacteria are important in triggering PsA, they may be those comprising skin flora, and found that levels of antibodies against streptococcal exotoxin are higher in patients with PsA comparing to healthy controls and patients with rheumatoid arthritis (9). These findings were further confirmed: higher levels of antibodies to different streptococcal cell wall components were also found in patients with PsA and cutaneous psoriasis (10). Regarding innate immune stimulation by bacterial components, it was observed that TLR2 expression

is upregulated in psoriatic skin lesions (11). TLR2 was also found to be overexpressed on immature dendritic cells obtained from patients with active PsA (12). Thus, it has been hypothesized that inappropriate gram-positive overstimulation on the innate immune system may have a role on PsA pathogenesis. To reaffirm this hypothesis and correlate these findings with disease activity, we intended to assess the expressions of TLR2 and TLR4 on peripheral blood monocytes and neutrophils from patients with active and inactive PsA, comparing to healthy controls.

Methods

Patients and controls

Our study group included PsA patients who were followed at the SpA outpatient clinic at the Rheumatology Division of the Hospital das Clnicas, the teaching hospital of the University of So Paulo, Brazil. All patients met CASPAR criteria for the diagnosis of PsA (13). Only patients with peripheral disease were included (RA-like, asymmetric oligoarthritis, distal interphalangeal arthritis or destructive arthritis). Patients with isolated axial disease were not included. The Disease Activity Score of 28 joint counts (DAS28) was used to assess clinical disease activity (14, 15). Active PsA was considered when DAS28 value was higher than 2.6. Demographic and medication data were also recorded. 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 0533/07). Written informed consent was obtained from all subjects prior to study commencement.

Assessment of membrane-bound expressions of TLR2 and TLR4

Venous blood samples were taken from PsA patients and 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 µl of 2% foetal calf serum (FCS) and

Funding: The Fundao de Amparo Pesquisa do Estado de So Paulo (FAPESP, protocol number 2007/58625-5), provided financial and material support. Competing interests: none declared.

Fig. 1. Representative data of one case of psoriatic arthritis : a) Scatterplot of peripheral leukocytes according size and granularity; b) definition of quadrants (positivity limits), according distribution of monocytes incubated with isotype control antibodies; c) definition of quadrants (positivity limits), according distribution of neutrophils incubated with isotype control antibodies; d) expression of TLR2 (horizontal axis) and CD14 (vertical axis) by monocytes; e) expression of TLR2 (horizontal axis) and CD66 (vertical axis) by neutrophils; f) expression of TLR4 (horizontal axis) and CD14 (vertical axis) by monocytes; g) expression of TLR4 (horizontal axis) and CD66 (vertical axis) by neutrophils. The percentage of cells (monocytes or neutrophils) in the upper right quadrant was considered as a measure of TLR expression in this work.

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 con-

jugated 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% paraformaldehyde prior to flow cytometric analysis. Ten thousand cells from each sample were then analysed in a three-fluorescence detector FAC-Scalibur™ 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 percentage of cells expressing TLR2 or TLR4 was counted, as the number of cells in the upper right quadrant. Positivity limits for dot plot charts were defined using isotype antibody controls. Representa-

tive data of one case are presented in Figure 1.

Statistical analysis

All analyses were performed with the SPSS 15.0 for Windows® (SPSS, Chicago, IL, USA) statistical software package. 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. *P*-values under 0.05 were considered significant.

Results

Forty-five patients with PsA (22 women, 23 men, mean age 52 ± 13 years, mean disease duration 15 ± 10 years) were included. Twenty-seven patients were considered with active disease (mean DAS 28 score 3.75) and 18 patients had inactive PsA (mean DAS 28 score 1.76). Four patients with active

Toll-like receptor 2 in psoriatic arthritis / S. Carrasco et al.

Table I. Expressions of TLR2 and TLR4 by circulating monocytes and neutrophils from patients with PsA, active PsA, inactive PsA and controls.

	TLR 2		TLR 4	
	Monocytes (%)	Neutrophils (%)	Monocytes (%)	Neutrophils (%)
PsA vs. controls	89 ± 17 vs. 71 ± 49 <i>p</i> =0.002*	6 ± 29 vs. 18 ± 31 <i>p</i> =0.07	2 ± 9 vs. 1 ± 3 <i>p</i> =0.23	2 ± 9 vs. 1 ± 3 <i>p</i> =0.48
Active PsA vs. controls	90 ± 17 vs. 71 ± 49 <i>p</i> =0.001*	5 ± 39 vs. 18 ± 31 <i>p</i> =0.15	2 ± 4 vs. 1 ± 3 <i>p</i> =0.33	2 ± 7 vs. 1 ± 3 <i>p</i> =0.69
Inactive PsA vs. controls	86 ± 18 vs. 71 ± 49 <i>p</i> =0.04*	8 ± 24 vs. 18,50 ± 31 <i>p</i> =0.10	2 ± 15 vs. 1 ± 3 <i>p</i> =0.29	2 ± 11 vs. 1 ± 3 <i>p</i> =0.42
Active PsA vs. inactive PsA	90 ± 17 vs. 86 ± 18 <i>p</i> =0.10	5 ± 39 vs. 8 ± 24 <i>p</i> =0.74	2 ± 4 vs. 2 ± 15 <i>p</i> =0.83	2 ± 7 vs. 2 ± 11 <i>p</i> =0.66

PsA: psoriatic arthritis. All *p*-values obtained by Mann-Whitney U-test.

PsA and two patients with inactive PsA were in use of anti-TNF- α agents. Only one patient was in remission state without medication and the others were in use of traditional disease-modifying anti-rheumatic drugs, some of them in combination (DMARDs) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): 23 on methotrexate (15 active and 8 inactive PsA), 4 on sulphasalazine (3 active and 1 inactive PsA), three on leflunomide (all active PsA) and one on cyclosporine (active PsA). Three patients with active PsA and five patients with inactive PsA were in use of NSAIDs without DMARDs. Thirty-two healthy subjects were included as a control group.

Table I demonstrates the expression of TLR2 and TLR4 on peripheral monocytes and neutrophils from PSA patients and controls. Expression levels of TLR2 was significantly higher on monocytes from PsA patients than on monocytes from healthy controls (89%±17% vs. 71%±49%, *p*=0.002). Both active PsA (90%±17% vs. 71%±49%, *p*=0.001) and inactive PsA patients (86%±18% vs. 71%±49%, *p*=0.004) revealed higher TLR2 expression on monocytes than controls. There was no significant difference between active and inactive PsA groups regarding TLR2 expression on circulating monocytes.

In contrast TLR4 was similarly expressed on monocytes of all groups of patients and controls. Furthermore on neutrophils, both TLR2 and TLR4 were similarly expressed in patients and controls. All data are presented in Table I.

Discussion

Promising recent reports point out to the potential role for TLRs in a variety of inflammatory disorders (16-18). Studies in psoriasis have shown that normal epidermal keratinocytes constitutively express TLR2 (19), while psoriatic skin lesions overexpress this receptor in comparison to normal skin (11). Because gram-positive bacteria such as *streptococcus* may have a relevant role in inducing PsA (9, 10), skin overexpression of TLR2 may be involved in the mechanism linking bacterial exposure and cutaneous inflammation in this disease.

In PsA, Candia *et al.* (12) reported that TLR2 expression (but not TLR4) was upregulated in immature dendritic cells obtained on cultured monocytes from active PsA patients, thus suggesting that gram-positive bacterial triggering and TLR2 overexpression also specifically contribute to the immunopathogenic process involved in joint disease related to psoriasis. On the other hand, in ankylosing spondylitis (AS, the prototype form of SpA) both TLR2 and TLR4 were found to be upregulated in peripheral blood monocytes (20). Thus, one can suggest that while PsA inflammation is specifically exacerbated by gram-positive stimulation via TLR2, AS inflammation may be boosted by gram-negative stimulation through TLR4. This hypothesis makes sense considering the cutaneous source of bacterial stimulation in psoriasis, mainly gram-positive (9), while in AS gut inflammation and increased gut permeability to gram-negative intesti-

nal flora may play a role in its pathogenesis (21).

Our results give additional support to this hypothesis, revealing that only TLR2 is upregulated on circulating monocytes of PsA patients irrespective of disease activity status. This could provide a preferential gram-positive overstimulation in PsA, which would lead to inflammatory activation. Probably Candia *et al.* (12) did not observe TLR2 overexpression in circulating monocytes (but only in immature dendritic cells) due to the small number of patients evaluated (only ten patients were considered in their study).

Our data and those from Candia *et al.* suggest that TLR2 overexpression in PsA may be a preferential route for bacterial triggering of the innate immune system (12). Reinforcing this idea, De Rycke *et al.* observed that anti-TNF- α blockade sharply abolishes TLR2 and TLR4 hyperexpression in AS patients (20). It suggests that TLR overexpression may have in fact a role in the inflammatory responses observed in these diseases. In our study, anti-TNF- α agents were similarly used in 4/27 active and 2/18 inactive PsA patients and did not influence our results.

In conclusion, the demonstration of TLR2 overexpression on circulating monocytes from patients with PsA may suggest a role of gram positive microorganisms triggering inflammatory responses in this disease. Functional studies are clearly warranted to clarify the pathological significance of TLR stimulation in PsA.

References

1. MOLL JM, HASLOCK I, MACRAE IF, WRIGHT V: Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behçet's syndrome. *Medicine (Baltimore)* 1974; 53: 343-64.
2. EKMAN P, KIRVESKARI J, GRANFORS K: Modification of disease outcome in Salmonella-infected patients by HLA-B27. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1527-34.
3. TAURIG JD, RICHARDSON JA, CROFT JT *et al.*: The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994; 180: 2359-64.
4. BAETEN D, DE KEYSER F, VEYS E, MIELANTS H: Immune linkages between inflammatory bowel disease and spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 342-7.
5. MEDZHTOV 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.
6. ROELOFS MF, ABDOLLAHI-ROODSAZ S, JOOSTEN LAB, VANDENBERG WB, RADSTAKE TRDJ: The orchestra of Toll-like receptor and their potential role in frequently occurring rheumatic conditions. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 338-48.
7. LOTZ S, AGA E, WILDE I *et al.*: Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leuk Biol* 2004; 75: 467-77.
8. SCHRÖDER NWJ, MORATH S, ALEXANDER C *et al.*: 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.
9. VASEY FB, DEITZ C, FENSKE NA, GERMAN BF, ESPINOZA LR: Possible involvement of group A streptococci in the pathogenesis of psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 1982; 9: 719-22.
10. RANTAKORIKKO K, RIMPILÄINEN M, UKSILA J, JANSSEN C, LUUKKAINEN R, TOIVANEN P: Antibodies to streptococcal cell wall in psoriatic arthritis and cutaneous psoriasis. *Clin Exp Rheumatol* 1997; 15: 399-404.
11. BEGON E, MICHEL L, BEATRICE F *et al.*: Expression, subcellular localization and cytokine modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol* 2007; 17: 497-506.
12. CANDIA L, MARQUEZ J, HERNANDEZ C, ZEA AH, ESPINOZA LR: Toll-like receptor-2 expression is upregulated in antigen-presenting cells from patients with psoriatic arthritis: a pathogenic role for innate immunity? *J Rheumatol* 2007; 34: 364-9.
13. TAYLOR W, GLADMAN D, HELLIWELL P, MARCHESONI A, MEASE P, MIELANTS H, CASPAR STUDY GROUP: Classification criteria for psoriatic arthritis: development of a new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2665-73.
14. PREVOO MLL, VAN'T HOFF MA, KUPER HH, VAN LEEUWEN MA, VAN DE PUTTE LBA, VAN RIEL PLGM: Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective and longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 44-8.
15. FRANSEN J, ANTONI C, MEASE PJ *et al.*: Performance of response criteria for assessing peripheral arthritis in patients with psoriatic arthritis: analysis of data from randomized controlled trials of two tumour necrosis factor inhibitors. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1373-8.
16. IWAHASHI M, YAMAMURA M, AITA T *et al.*: Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 298-308.
17. ZHANG X, GLOGAUER M, ZHU F, KIM TH, CHIU B, INMAN RD: Innate immunity and arthritis: neutrophil Rac and Toll-like receptor 4 expression define outcomes in infection-triggered arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1297-304.
18. YAVUZ S, ELBIR Y, TULUNAY A, EKSIÖGLÜ-DEMIRALP E, DİRESKENELİ H: Differential expression of toll-like receptor 6 on granulocytes and monocytes implicates the role of microorganisms in Behçet's disease etiology. *Rheumatol Int* 2008; 28: 401-6.
19. BAKER BS, OVIGNE JM, POWLES AV, CORCORAN S, FRY L: Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2003; 148: 670-9.
20. DE RYCKE L, VANDOOREN B, KRUIJTHOF E, DE KEYSER F, VEYS EM, BAETEN D: Tumor necrosis factor α blockade treatment downmodulates the increased systemic and local expression of toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2146-58.
21. DE KEYSER F, ELEWAUT D, DE VOS M *et al.*: Bowel inflammation and the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am* 1998; 24: 785-813.