

FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DE MARCADORES DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS EM
PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA**

LAIANA SCHNEIDER

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DE MARCADORES DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS EM
PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA**

LAIANA SCHNEIDER

Orientador: Prof. Dr. Rafael Mendonça da Silva Chakr

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2018

Schneider, Laiana

Estudo de marcadores de monócitos/macrófagos em pacientes com Esclerose Sistêmica. -- 2018.

75 f.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Mendonça da Silva Chakr

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. monócitos/macrófagos. 2. CD16. 3. subpopulações de monócitos 4. citometria de fluxo. 5. esclerose sistêmica. I. Chakr, Rafael Mendonça da Silva. II. Xavier, Ricardo Machado.

*“Cada indivíduo dedica tempo, energia, conhecimento...para cultivar a paz,
desenvolver o bem... de acordo com o caráter e valores que têm.”*

Dirceu Gassen (2018).

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor incondicional, carinho e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador, Dr. Rafael Chakr, pelo apoio, aprendizado, disponibilidade e, principalmente, por acreditar na minha capacidade de finalizar este trabalho.

Ao professor Dr. Ricardo Xavier, pela contribuição em minha formação acadêmica, um exemplo de pesquisador e profissional dedicado.

Aos meus amigos, por aceitarem meus “não” para os bares e festas, pelo carinho e atenção nos momentos de turbulência.

À equipe do Laboratório Zanol pela amizade, em especial à Natália, pelos ensinamentos que influenciaram no meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Sou grata por todo apoio e ajuda nesta reta final de conclusão do doutorado.

A todos os professores e médicos do Serviço de Reumatologia, e que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho. Agradeço a Gabriela, por todo carinho em forma de café.

Aos alunos de iniciação científica do Ambulatório da Esclerose Sistêmica que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a Helena e a Marianna.

Aos pacientes que aceitaram participar deste trabalho.

Ao PPGCM/UFRGS pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao FIPE/HCPA pelo suporte financeiro.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Base teórica: A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune progressiva e caracterizada por vasculopatia e fibrose, que pode ser subclassificada em subtipo cutâneo difuso e cutâneo limitado. Sua apresentação clínica é altamente heterogênea, com acometimento da pele e órgãos internos em variado grau de gravidade e extensão e apresenta a maior taxa de letalidade entre as doenças do tecido conjuntivo. Embora a ativação do sistema imune tenha sido reconhecida há muito tempo, os mecanismos responsáveis pelo início da autoimunidade e o papel dos monócitos e macrófagos nas vias efetoras imunes da patogênese da ES permanecem pouco compreendidos.

Objetivo: avaliar subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) circulantes no sangue de pacientes com ES e possível associação destas subpopulações com manifestações da doença.

Métodos: cinquenta pacientes consecutivos preenchendo os critérios de classificação ACR / EULAR de 2013 para ES foram incluídos em estudo transversal. Subpopulações de monócitos foram identificadas com base na expressão de CD64, CD14 e CD16, avaliadas por citometria de fluxo, e correlacionadas com as características clínicas dos pacientes; ainda, foram estudadas as expressões de HLA-DR, CD163, CD169 e CD206, nos monócitos. Trinta e oito indivíduos saudáveis pareados por idade e sexo foram recrutados como grupo controle.

Resultados: Os pacientes com ES tiveram um aumento no número de monócitos do sangue periférico circulantes em comparação com indivíduos saudáveis. Contagens absolutas de subpopulações CD16+ de monócitos (intermediários e não-clássicos) foram maiores em pacientes com ES. Não houve associação entre subpopulações de monócitos e qualquer manifestação clínica avaliada. Pacientes com ES difusa apresentaram maior expressão de CD169.

Conclusão: pacientes com ES apresentam maior contagem de todas as subpopulações de monócitos, em relação ao grupo controle, com perfil fenotípico ativado. Não houve associação entre subpopulações de monócitos e as manifestações fibróticas avaliadas. CD169 se demonstrou mais representativo na ES difusa, sendo um marcador promissor para diferenciar os subtipos da doença.

Palavras chave: esclerose sistêmica, monócitos/macrófagos, marcadores celulares, citometria de fluxo, patogênese.

ABSTRACT

Background: Systemic sclerosis (SSc) is a progressive autoimmune disease characterized by vasculopathy and fibrosis which can be subclassified into diffuse cutaneous (dSSc) and limited cutaneous (lSSc) subtypes. The clinical presentation is highly heterogeneous, with involvement of the skin and internal organs in varying degrees of severity and extent and has the highest rate of lethality among connective tissue diseases. Although activation of the immune system has long been recognized, the mechanisms responsible for the onset of autoimmunity and the role of monocytes and macrophages in the immune effector pathways of ES pathogenesis remain poorly understood.

Objective: evaluate circulating blood monocyte subpopulations (classical, intermediate and non-classical) and their possible association with disease manifestations.

Methods: fifty consecutive patients fulfilling the 2013 ACR/EULAR classification criteria for SSc were included in a cross-sectional study. subpopulations of monocytes were identified based on the expression of CD64, CD14 and CD16, evaluated by flow cytometry, correlated with the clinical characteristics of the patients; furthermore, the expression of HLA-DR, CD163, CD169 and CD206 in the monocytes was studied. Monocyte subpopulations were identified based on their CD14 and CD16 surface expression, evaluated with flow cytometry, and were correlated with patients' clinical characteristics. Thirty-eight age- and sex-matched healthy individuals were recruited as a control group.

Results: SSc patients had an increased number of circulating peripheral blood monocytes compared to healthy subjects. Absolute counts of CD16+ (intermediary and non-classical) monocyte subpopulations were higher in SSc patients. lSSc subjects showed greater forced vital capacity than dSSc patients. There was no association between monocyte subpopulations and any clinical manifestation.

Conclusion: we identified higher counts of all monocyte subpopulations in SSc patients, with an activated phenotypic profile as compared to control group. There was no association between monocyte subpopulations and major fibrotic manifestations. CD169 was shown to be more representative in diffuse ES, being a promising marker for differentiating subtypes of the disease.

Key words: systemic sclerosis, monocytes / macrophages, cell markers, flow cytometry, pathogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figuras da tese

- Figura 1. Modelo esquemático da estratégia da busca.....**Erro! Indicador não definido.**
 Figura 2. Esquema do processo fisiopatológico que envolve a ES.....**Erro! Indicador não definido.**
 Figura 3. Esquema de ativação e diferenciação das subpopulações de monócitos/macrófagos.
 27

Figuras do artigo

- Figure 1. Identification of monocyte subpopulations. 48
 Figure 2. Monocyte subpopulations according to the membrane expression of CD14 and CD16 in systemic sclerosis (SSc) patients, healthy controls (HC). 51
 Figure 3. Correlation about CD16+ monocyte subpopulation. 52
 Figure 4. Expression of percentual and Mean fluorescence intensity in monocyte subpopulations. 53

LISTA DE TABELAS

Tabelas da tese

Tabela 1. Critérios de classificação para Esclerose ACR/Eular de 2013.....	21
Tabela 2. Principais medidas de desfecho utilizadas em estudos e na prática assistencial de esclerose sistêmica.	22
Tabela 3. Estudos que avaliaram marcadores em monócitos/macrófagos por citometria de fluxo.	30

Tabelas do artigo

Table 1. Demographic, clinical, and laboratory features of SSc patients and controls	49
Supplemental table 1. Spearman correlation coefficient values.	58
Supplemental table 2. Analysis of the absolute counts of CD16+ monocytes in relation to the time of disease separated by tercil.	58
Supplemental table 3. Comparison of the MFI markers among the monocyte subpopulations	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
ACR	<i>American College of Rheumatology</i> – Colégio Americano de Reumatologia
Ag	Antígenos
ANA	Anticorpos Antinucleares ou FAN- Fator Antinuclear
Anti-Sc170	Anticorpo antitopoisomerase 1
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
CD	<i>Cluster of differentiation</i> - cluster de diferenciação celular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPU	Capilaroscopia
CVF	Capacidade vital forçada
DC	<i>Dendritic cells</i> - células dendríticas
DDTC	Doença difusa do tecido conjuntivo
DIP	Doença intersticial pulmonar
DLCO	Capacidade de Difusão de Monóxido de Carbono
ES	Esclerose Sistêmica
ES-d	Esclerose Sistêmica Cutânea Difusa
ES-l	Esclerose Sistêmica Cutânea Limitada
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i> - Liga Europeia Contra o Reumatismo
FRy	Fenômeno de Raynaud
	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> - fator estimulante de colônias de
GM-CSF	granulócitos-macrófagos
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> - fator estimulante de colônias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> – intensidade de fluorescência média
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade

MRC-1	<i>mannose receptor-1</i> , Receptor de manose-1 ou CD206
NK	<i>Natural Killers</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> - espécies reativas de oxigênio
TGI	Trato gastrointestinal

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Negativo
%	Porcento
+	Positivo
+	Mais
<	Inferior / menor que
>	Superior / maior que
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
kDa	Quilodalton
mL	Mililitro
RPM	Rotações por minuto
s	Solúvel
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. ESTRATÉGIA PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	16
2.2. ESCLEROSE SISTÊMICA	17
2.2.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	17
2.2.2. ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA	18
2.2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO	20
2.2.4. PROGNÓSTICO E TRATAMENTO	24
2.3. MONÓCITOS/MACRÓFAGOS	24
2.3.1. ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS / MACRÓFAGOS	26
2.4. ESTUDOS AVALIANDO MARCADORES DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS NA ESCLEROSE SISTÊMICA	28
3. MARCO TEÓRICO	36
4. JUSTIFICATIVA	37
5. OBJETIVOS	38
5.1. OBJETIVOS GERAIS	38
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
7. ARTIGO ORIGINAL	44
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	65
10. ANEXOS	66
10.1 CARTA DE APROVAÇÃO	66
10.2 QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO SISTÊMICA	67
10.3 TERMO DE CONSENTIMENTO - PACIENTES	70
10.4 STROBE STATEMENT	72
10.5 TERMOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DE ARTIGOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA	74
10.6 FLUXOGRAMA DE ESTUDOS	75

1. INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo caracterizada pela presença de autoanticorpos, inflamação, vasculopatia e fibrose progressiva da pele e de órgãos internos, apresentando manifestações clínicas heterogêneas. (1-3) A etiologia complexa envolve interação de fatores genéticos e ambientais, (4) como em muitas outras doenças autoimunes, as mulheres são mais acometidas em relação os homens (proporção de 4:1) e a etnia desempenha um papel crítico nas manifestações da doença. (5) Os mecanismos que desencadeiam ou perpetuam o fenótipo da doença ainda não foram totalmente elucidados. Sendo assim, não há tratamento específico para a doença e esta se associa a alta morbidade e mortalidade. (6) Uma das hipóteses sugeridas é a de que fatores pró-inflamatórios e/ou pró-fibróticos sejam produzidos ou ativados por células do sistema imune inato, principalmente monócitos e macrófagos. (7)

Os monócitos são uma heterogênea população de células sanguíneas mononucleares que migram para os tecidos dando origem aos macrófagos. (8) Estes, por sua vez, são mediadores chave da imunidade adaptativa e humoral e contribuem para remodelação tecidual. Determinadas condições ambientais levam os macrófagos a sofrerem ativação clássica ou alternativa, que definirá um perfil pró ou anti-inflamatório. (9) A hipótese de que monócitos e macrófagos estão envolvidos na patogênese da ES está relatada em antigos estudos histopatológicos que mostraram predominância de macrófagos em infiltrados intersticiais e perivasculares de pessoas com a doença, (10) e mais recentemente por estudos com avaliação de expressão celular, que permitem diferenciar e caracterizar células, que apontaram proporção elevada de monócitos e macrófagos anti-inflamatórios no sangue periférico de pacientes comparados a indivíduos saudáveis. (11) Reforçam esta hipótese as evidências de que, em pacientes com ES, os monócitos circulantes possam estar presentes em distintas subpopulações, com funções diferentes, e que possam ser fontes para macrófagos diferenciados. (12)

Os monócitos podem ser classificados em subpopulações conforme a expressão e intensidade de alguns marcadores de superfície celular, como CD14 e CD16. Estas subpopulações foram definidas como monócitos clássicos, intermediários e monócitos não-clássicos. (13) As subpopulações de monócitos expressam alguns genes que lhes conferem diferenças fenotípicas e funcionais, como diferenças quanto à expressão de receptores para antígenos, quimiocinas e citocinas. (14) Não há um consenso em relação às citocinas produzidas preferencialmente por cada subpopulação de monócitos.

Os macrófagos podem ser classificados conforme sua maturação e/ou via de ativação. Alguns autores se referem aos macrófagos como células M1 e M2, (15, 16) associados aos fenótipos de ativação clássico e alternativo, baseados na nomenclatura Th1/Th2 utilizada para classificar os linfócitos T *helper*. (17) O predomínio de citocinas como IL-12, IL-18 e IFN- γ em um microambiente leva a diferenciação de células Th1 que secretam TNF- α , IL-2 e IFN- γ , promovendo ativação do padrão M1 que expressa receptores opsonínicos e está associado com destruição tecidual e inflamação, sendo responsável pela produção de citocinas inflamatórias, além do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) e nitrogênio. (18) Em contrapartida, o predomínio de IL-10, IL-4 e IL-13 promove a geração de linfócitos Th2 e ativação de macrófagos pela via alternativa que apresentam maior expressão de receptores CD163 “scavenger” para hemoglobina e estão envolvidos na fagocitose, reparo tecidual e exercem papel imunorregulador. (19-23) Portanto, macrófagos M2 diminuem o processo inflamatório através da produção de fatores anti-inflamatórios, IL-10, TGF- β e estimulam a expressão de receptores de manose (MRC-1, *mannose receptor-1* ou CD206). (18, 24) Ainda, o HLA-DR é um receptor de membrana que pode ser usado para avaliar ativação e maturação em monócitos/macrófagos. (25)

Embora a ativação do sistema imune tenha sido reconhecida há muito tempo, os mecanismos responsáveis pelo início da autoimunidade e o papel das vias efetoras imunes na patogênese da ES permanecem incompletamente compreendidos. A avaliação dos receptores de superfície auxilia no reconhecimento e diferenciação celular, principalmente quando relacionados a distintas funções de atuação. Evidências em humanos e murinos sugerem que o aumento de monócitos possa ser um indicador de várias doenças inflamatórias e que estas células podem se diferenciar em subgrupos inflamatórios ou anti-inflamatórios. Portanto, evidenciar receptores diferenciados em células de pacientes com ES, envolvidos em mecanismos que modulam inflamação e fibrose mediada por monócitos circulantes e macrófagos, pode proporcionar oportunidades terapêuticas para tratar a ES nos estágios mais iniciais da doença. Neste estudo, buscamos caracterizar as subpopulações de monócitos e diferentes expressões quanto a receptores de função e ativação, em pacientes com ES atendidos em um hospital público do Sul do Brasil.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Objetivo da revisão

Esta revisão tem intenção de reunir os dados disponíveis sobre os principais marcadores envolvidos na caracterização e ativação de monócitos e macrófagos na ES, analisados por citometria de fluxo, com ênfase em seu papel na patogênese. Há fortes evidências de que estas células contribuem para a progressão e talvez o início da ES. À luz desta evidência, esta revisão examina o papel dos monócitos e macrófagos na ES.

Descobertas Recentes

A maioria dos autores relatam haver monocitose em pacientes com ES. Estudos recentes demonstram haver subpopulações de monócitos que, possivelmente, permeiam os tecidos em macrófagos diferenciados, levando à inflamação localizada e, por fim, à indução de fibrose. Atualmente, não existe terapia efetiva, embora avanços nas pesquisas com transplante autólogo de células-tronco tem demonstrado resultados promissores. A exploração da perturbação inata do sistema imunológico se faz necessária na busca de tratamentos mais específicos para esta doença tão complexa.

2.1. ESTRATÉGIA PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada nos principais marcadores envolvidos na caracterização e ativação de monócitos e macrófagos na ES, analisados por citometria de fluxo, com ênfase em seu papel na patogênese. Há fortes evidências de que estas células contribuem para a progressão e talvez o início da ES. À luz desta evidência, esta revisão examina o papel dos monócitos e macrófagos na ES.

A revisão sistemática da literatura foi conduzida nas bases de dados eletrônicas PubMed, BIREME e Scielo para artigos publicados até 07 de novembro de 2018, usando termos de pesquisa predefinidos para “monocytes”, “macrophages”, “Systemic Sclerosis”, “Scleroderma, Localized”, “Scleroderma, Diffuse” e “Flow cytometry” e suas combinações ou traduções. (Anexo 10.5). A busca foi restringida á trabalhos cujo idioma fosse inglês, espanhol, italiano ou português. Na figura 1 estão esquematizadas as estratégias de busca.

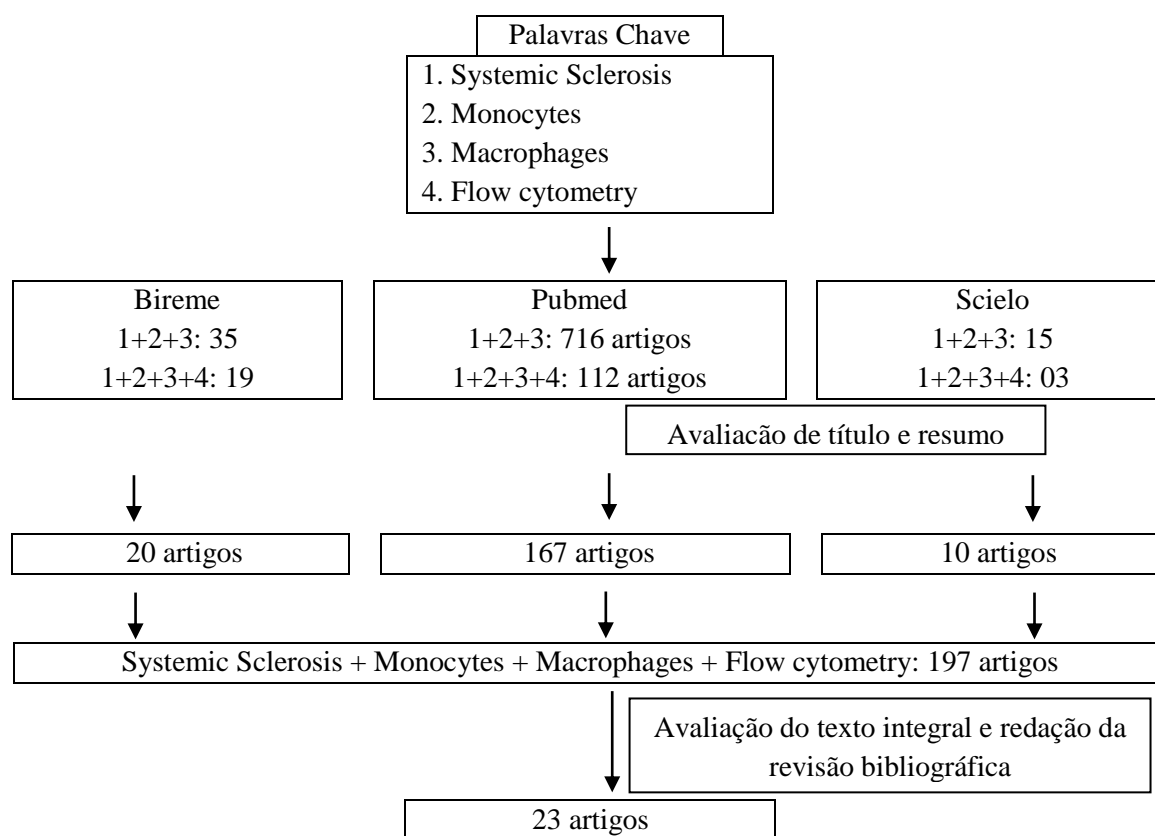


Figura 1. Modelo esquemático da estratégia da busca.

Última atualização em 07 de dezembro de 2018.

Fonte: elaborado pela autora (2018).

A inclusão dos artigos para a esta revisão da literatura foi restringida ao uso da técnica de citometria de fluxo para análise de marcadores celulares em monócitos macrófagos (estudos compilados no item 2.4. Estudos avaliando marcadores de monócitos/macrófagos na esclerose sistêmica).

2.2. ESCLEROSE SISTÊMICA

2.2.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A ES, ou esclerodermia, é uma doença inflamatória crônica do tecido conjuntivo, de etiologia pouco conhecida que resulta em manifestações clínicas multifacetadas com elevada morbidade e mortalidade. É caracterizada por fibrose e dano microvascular em diferentes graus, afetando órgãos e tecidos, apresentando diversas manifestações clínicas e laboratoriais, com curso clínico e prognóstico variáveis. (26) Diversos órgãos podem ser acometidos, com

destaque para a pele, pulmão, coração, rins e trato gastrointestinal (TGI), sendo sua expressão fenotípica amplamente heterogênea e seu prognóstico determinado pelo acometimento visceral predominante. (27, 28) A ES pode ser dividida em dois subgrupos de pacientes de acordo com o acometimento cutâneo. Na forma limitada, a esclerodermia ocorre distal a cotovelos e joelhos e em face. Na forma difusa, ocorre acometimento de tronco concomitante. (29)

É uma doença considerada rara, apresentando baixa prevalência e incidência. A prevalência é bastante variável, apresentando 1 a 5 casos por 1.000 habitantes nos Estados Unidos, enquanto que no Reino Unido e no Japão apresenta, respectivamente, 31 e 38 casos por milhão de habitantes. Quanto à incidência, apresenta taxas que variam em 3,8 a 13,9 novos casos por milhão de habitantes ao ano, em sua maioria mulheres entre 30 e 45 anos. (30) Negros desenvolvem a doença mais precocemente com predomínio da forma cutânea difusa e pior prognóstico. (31) Estudos americanos sugerem que familiares de 1º grau apresentam um risco relativo ao redor de 13 para acometimento da doença, sugerindo que histórico familiar seja um importante fator de risco para a doença. (32) Apesar de não existirem dados brasileiros, estima-se uma incidência de 12 casos por milhão de habitantes e prevalência de 105 casos por milhão de habitantes. (33)

2.2.2. ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

Ainda que a etiologia e a patogênese da ES permaneçam obscuras, existem evidências de envolvimento genéticos, exposição a drogas, fatores ambientais e ocupacionais, como solventes orgânicos e infecções virais, aliados a defeitos nos processos de tolerância central e periférica, como devido a redução e/ou função de células reguladoras, entre outros fatores que contribuem para o desencadeamento da doença e surgimento dos sintomas. (34-37)

A etiologia da ES envolve anormalidades vasculares e imunológicas, que convergem para processos fibróticos em vasos, tecidos e órgãos. A figura 2 apresenta de forma esquemática características da fisiologia e patogenia que são observadas na doença, como: deposição excessiva de colágeno e outras macromoléculas na pele e órgão (como nos pulmões, rins, trato gastrointestinal); lesões vasculares; e alterações da imunidade humoral e celular decorrente da autoimunidade. (36)

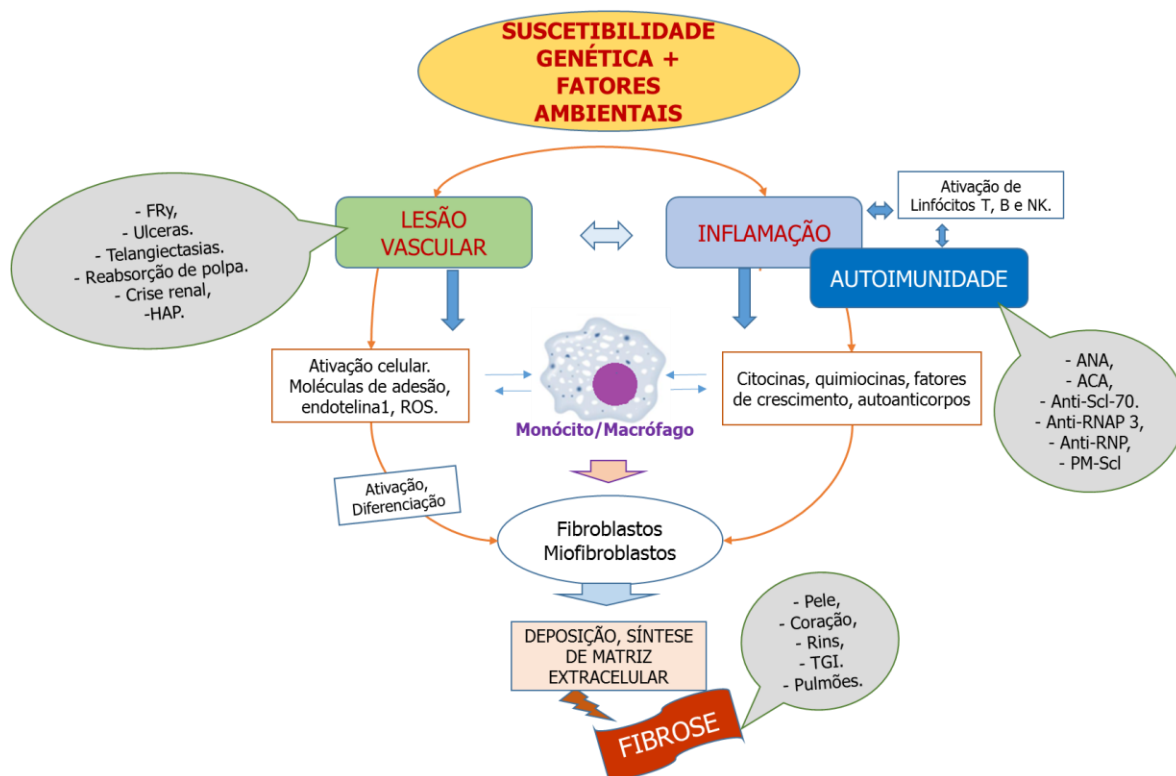


Figura 2. Esquema do processo fisiopatológico que envolvem a ES.

Legenda. FRY: Fenômeno de Raynaud; HAP: hipertensão de arterial pulmonar; TGI: trato gastrointestinal; ANA: anticorpo anti-nuclear; ACA: anti-centrômero; Anti-RNAP 3: anti-RNA polimerase III; anti-SCL-70: anti-topoisomerase 1; Anti-RNP: anti- fração nuclear de ribonucleoproteínas; PM-Scl: anticorpo anti-polimiosite escleroderma.

Fonte: elaborado pela autora (2018).

A principal característica na ES é a fibrose. O processo fibrótico ocorre devido a inflamação persistente e em resposta a uma injúria vascular idiopática, (38) processo que ativa o sistema imunológico inato e adaptativo. A excessiva ativação endotelial leva a um aumento de expressão de moléculas de adesão e de citocinas e quimiocinas, além de ativação plaquetária e da produção de mediadores vasoconstritores e pró-trombóticos, gerando instabilidade vascular e lesão tecidual por isquemia-reperfusão. (36)

Em resposta a este processo, muitos subtipos celulares inflamatórios são recrutados, principalmente: células T *helper* do tipo 2 (Th2), as quais secretam grandes quantidades de IL-4, IL-5 e IL-13; células B produtoras de autoanticorpos e IL-6; e monócitos/macrófagos produtores de TGF- β (*Transforming Growth Factor*- β). (36)

Para resolução da inflamação e promoção da cicatrização, é ativado um fenótipo de macrófagos anti-inflamatórios. Durante a lesão aguda do tecido, monócitos são recrutados da

circulação para o local da inflamação, passando a denominação de macrófagos. Quando o reparo epitelial não consegue eliminar a resposta de lesão, os mecanismos de reparo são ativados e os monócitos/macrófagos passam a apresentar um fenótipo anti-inflamatório, iniciando a fase de resolução e reparo tecidual. (39) Os fibroblastos se tornam ativados pelos mediadores anti-inflamatórios e pró-fibróticos, com atuação comportamental semelhante a de macrófagos, se diferenciam em miofibroblastos e passam a produzir grandes quantidades de ROS) e demasiadas quantidades de moléculas da matriz extracelular (MEC), sendo o colágeno a mais importante, resultando em fibrose da pele e órgãos internos. (40, 41)

Uma melhor compreensão a respeito das interações dessas células imunológicas e processos envolvidos poderá clarificar a patogênese da doença e, possivelmente, levar a melhores opções de tratamento para pacientes com ES.

2.2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

As manifestações clínicas, a evolução da doença e a sobrevida desses pacientes são amplamente variáveis e, em geral, relacionadas ao subtipo de doença e a presença de diferentes autoanticorpos. O diagnóstico é feito através de achados clínicos; porém pode levar meses ou anos para ser definido, isso porque, as alterações esclerodermiformes aparecem tardiamente e o quadro inicial geralmente só se apresenta com isquemia-reperfusão que é notada como fenômeno de Raynaud (FRy), dores ou edema articular, o que torna a sua diferenciação de outras doenças inflamatórias difusas altamente complexa. A ativação do sistema imune celular e humoral participa de forma ativa nestes processos. Os principais sintomas na ES são calcinose, FRy, dismotilidade do esôfago, esclerodactilia e telangiectasias. Diversos órgãos podem ser acometidos, com destaque para a pele, pulmão, coração, rins e TGI, sendo sua expressão fenotípica heterogênea e seu prognóstico determinado predominantemente pelo acometimento visceral. (27, 42, 43)

Com a finalidade de homogeneizar a definição de caso para inclusão de pacientes em pesquisas clínicas, bem como para guiar o diagnóstico desta doença e auxiliar na predição do prognóstico da doença, foram desenvolvidos critérios de classificação para a ES. O *American College of Rheumatology* (ACR), em 1980, estabeleceu os critérios preliminares de classificação para ES. (44) (ANEXO 10.2). Posteriormente, *LeRoy* e *Medsger*, em 2001, incorporaram dados obtidos a partir da capilorosopia (CPU) e pesquisa de autoanticorpos específicos para o diagnóstico precoce de ES. (45) Em 2013, a *European League Against*

Rheumatism (EULAR) e o grupo *EULAR Scleroderma Trial and Research* (EUSTAR) publicaram os novos critérios de classificação para ES (46) mais sensíveis (91% vs. 75%) e específicos (92% vs. 72%) que os critérios do ACR de 1980. Em um escore com pontuação máxima de 19 pontos, o caso é classificado como ES se preencher 9 pontos ou mais de acordo com os critérios. Na tabela 1 estão apresentados os critérios de classificação utilizados atualmente.

Tabela 1. Critérios de classificação para Esclerose ACR/Eular de 2013.

Critérios de classificação ACR/EULAR 2013	
Espessamento cutâneo proximal às metacarpofalangeanas (critério suficiente)	9
Espessamento cutâneo dos dedos (apenas o maior escore):	2
<i>Puffy fingers</i>	4
Esclerodactilia (distal às MCF e proximal às IFP – sobre a falange proximal)	
Lesões nas pontas dos dedos (apenas o maior escore):	
Úlceras digitais	2
<i>Pitting scar</i>	3
Telangiectasia	2
Capilaroscopia anormal	2
Hipertensão arterial pulmonar OU doença intersticial pulmonar	2
Fenômeno de Raynaud	3
Autoanticorpos associados à ES:	3
Anti-centrômero OU Antitopoisomerase I (anti-Sc170) OU anti-RNA polimerase III	

Pacientes com pontuação ≥ 9 são classificadas como apresentando Esclerose Sistêmica definitiva.

MCF: metacarpofalangeana; IFP: interfalangeana proximal.

Fonte: Adaptado de VAN DEN HOOGEN e col (2013).

A presença de espessamento cutâneo proximal às articulações metacarpofalangeanas soma nove pontos e é considerada suficiente para o diagnóstico. Ainda, esse critério considera também o tipo de acometimento cutâneo, tipo de lesões nas pontas dos dedos, telangiectasias, FRy, anormalidades na CPU, hipertensão de artéria pulmonar (HAP) ou doença intersticial pulmonar (DIP) e autoanticorpos específicos para ES. (26)

O diagnóstico é essencialmente clínico, sendo feito a partir da história e do exame físico, podendo ser complementado por alguns exames tais como pesquisa de fator antinuclear, raio-x (RX) ou tomografia computadorizada (TC) do tórax, espirometria, ecocardiograma, difusão de monóxido de oxigênio (DLCO), capacidade vital forçada (CVF) e o escore de Rodnan modificado (tabela 2).

Tabela 2. Principais medidas de desfecho utilizadas em estudos e na prática assistencial de esclerose sistêmica. Critérios de classificação para Esclerose ACR/Eular de 2013.

Fenômeno fisiopatológico	Manifestação clínica	Medida de desfecho	Comentário
FIBROSE	Esclerodermia	Escore de Rodnan modificado	Escore validado e amplamente utilizado em estudos clínicos que avalia por meio de palpação 17 áreas do corpo, variando de 0 a 51, sendo valores maiores associados a maior espessamento e aderência da pele.
	Pneumonite e fibrose pulmonar	Radiografia de tórax	Exame acessível que pode demonstrar alterações específicas, sendo particularmente útil nos casos com maior comprometimento tecidual. Apesar de menor radiação do que a tomografia computadorizada, perde em acurácia diagnóstica.
		Tomografia computadorizada de tórax	Exame com boa sensibilidade e especificidade diagnóstica de pneumonite com maior exposição à radiação, especialmente com tomógrafos mais antigos. Também é particularmente útil na avaliação de complicações pulmonares, tais como bronquiectasias e neoplasias.
		Capacidade vital forçada	Exame validado e amplamente utilizado em pesquisa e prática assistencial para a identificação precoce e o acompanhamento de alterações funcionais de DIP.
		Difusão com monóxido de carbono	Exame validado e amplamente utilizado em pesquisa e prática assistencial para a identificação precoce e o acompanhamento de alterações funcionais de DIP, podendo se alterar

VASCULOPATIA	HAP	Ecocardiograma com medida da PSAP	também na HAP. Exame utilizado na rotina assistencial para diagnóstico e monitoramento de HAP. Apresenta algumas limitações de acurácia, principalmente associadas ao operador e a outras condições clínicas que possam interferir nas medidas de fluxos e pressões intracardíacas.
	Arteriopatia periférica	Fenômeno de Raynaud, úlceras digitais, capilaroscopia periungueal	Alterações perfusionais isquêmicas transitórias ou persistentes que possam causar lesão tecidual em vasos, pele e anexos fazem parte do acompanhamento clínico e de pesquisa, podendo se associar a pior qualidade de vida e menor sobrevida.

DIP: doença intersticial pulmonar; HAP: hipertensão de artéria pulmonar; PSAP: pressão sistólica em artéria pulmonar.

Fonte: autora (2018).

O envolvimento visceral da ES é fator que define o prognóstico da doença no paciente. As manifestações cardíacas podem ser primárias, quando há fibrose do músculo cardíaco levando a arritmias cardíacas, ou secundárias, quando são resultado do envolvimento pulmonar e/ou do rim. (47) As complicações pulmonares são a causa mais comum de morte na ES, sendo o envolvimento pulmonar gerado por inflamação e fibrose do interstício pulmonar (DIP), pneumonite, ou por hipertensão arterial pulmonar (HAP). (3, 27, 48)

O segundo sistema mais acometido pela ES é o TGI, perdendo em frequência apenas para a pele. A dismotilidade esofágica ocorre em 75-90% dos pacientes com ES. (27, 28) Esta disfunção motora leva a doença de refluxo gastroesofágico que pode apresentar manifestações clínicas de pirose, regurgitação e disfagia, levando a estenose e esôfago de Barrett com potencial risco para desencadeamento de câncer do esôfago. Ainda, pacientes com disfunção do TGI podem apresentar constipação e dificuldade de evacuação, bem como diarreia e incontinência fecal. (27)

As manifestações cutâneas são apresentadas com endurecimento progressivo da pele e aderência aos planos profundos, consiste na manifestação mais característica da doença, presente em mais de 90% dos pacientes. (49) A extensão do comprometimento cutâneo pode

ser quantificada através do escore modificado de Rodnan e tem sido considerada um marcador de gravidade da doença e preditor independente de mortalidade. (50)

2.2.4. PROGNÓSTICO E TRATAMENTO

Nos últimos anos houve um aumento progressivo da sobrevida dos pacientes, principalmente pelo diagnóstico ocorrer mais precocemente. Contudo, permanecem altas as taxas de morbimortalidade, sendo considerada a mais grave das doenças do tecido conjuntivo. (30) O risco de morte em pacientes com ES é 3,5 vezes maior, quando comparado ao risco esperado para indivíduos do mesmo sexo e idade. (6)

Em linhas gerais, o tratamento é feito de acordo com a manifestação clínica, podendo incluir imunossuppressores, inibidores de bomba de próton, vasodilatadores e anti-hipertensivos. As manifestações renais da ES, que eram a principal causa de morte na doença, hoje têm melhor prognóstico devido ao uso rotineiro dos inibidores da enzima conversora de angiotensina, visto que o marco da manifestação renal é a crise hipertensiva com falência renal aguda, quadro conhecido como crise renal esclerodérmica. (47)

Atualmente, não existe tratamento modificador do curso de doença, sendo a escolha do medicamento realizada de forma individualizada, considerando-se riscos e benefícios de cada intervenção. Considerando-se a rede de agentes que participam da fisiopatologia da ES, intervenções pontuais no sistema imune não têm apresentado efeitos consistentes. Mais recentemente, evidências têm surgido sobre os transplantes autólogos de células-tronco com resultados promissores. (51-54)

Estudos têm se voltado para o desenvolvimento de terapias antifibróticas efetivas, porém, até o momento, não há nenhum fármaco aprovado para esse fim no tratamento da ES. Diante dos avanços na elucidação da fisiopatologia da ES, esforços têm sido empreendidos para o desenvolvimento de fármacos com potencial modificador do curso da doença.

2.3. MONÓCITOS/MACRÓFAGOS

Os monócitos são células da imunidade inata, tendo função de profissionais apresentadoras de antígenos (APCs), que apresentam uma enorme plasticidade e habilidade de adaptação a diversos sinais do microambiente e, assim, desempenham diferentes funções

como manutenção do equilíbrio homeostático, defesa contra agentes infecciosos, tumores, inflamação, ativação de linfócitos T e reparo tecidual. (55, 56) São células mieloides, produzidas na medula óssea, que permanecem poucos dias circulantes no sangue e que se diferenciam em macrófagos ao migrarem para os tecidos, ou podem se diferenciar em células dendríticas (DCs – *dendritic cells*). Tem sido proposto que as DCs circulantes, em humanos (CD1c+, CD141+), não são onipotentes, podendo representar formas precursoras que venham a sofrer diferenciação final e especialização *in situ*. (57)

Monócitos e macrófagos apresentam em sua superfície celular expressão de CD64, que é uma glicoproteína de membrana que intermedia a endocitose, a fagocitose, a toxicidade celular anticorpo-dependente, a liberação de citocinas e a geração de superóxido. Este marcador é utilizado em estratégias de citometria de fluxo para delimitar regiões de monócitos para caracterização celular quanto subpopulações destas e expressões anormais de receptores. Pela heterogeneidade de função, os monócitos culminam no desenvolvimento e diferenciação em subpopulações pela distinta expressão de receptores de membrana celular. Seus fenótipos encontrados em modelo murino e nos humanos diferem em resposta aos fatores presentes durante a inflamação ou infecção. A subpopulação de monócitos “clássicos” (humanos: CD14⁺⁺ e CD16⁻ / murino: CD11b⁺, CD62L⁺ e Ly6C⁺⁺), representa cerca de 85% dos monócitos circulantes no sangue periférico, estes produzem citocinas pró-inflamatórias e, quando recrutados para os tecidos, atuam como macrófagos inflamatórios (M1). Já os monócitos de patrulha, que são ativados para reparo tecidual, produzem citocinas anti-inflamatórias e mediadores pró-fibróticos, representam uma população menor e em diferentes níveis de expressão de CD14/ Ly6C demonstrando um alto grau de plasticidade e uma diferenciação em duas subpopulações: monócitos “não-clássicos” (humanos: CD14⁺, CD16⁺⁺ / murino: CD11b⁺, CD62L⁻, Ly6C^{l-}) e “intermediários” (humanos: CD14⁺, CD16⁺ / murino: CD11b⁺, CD62L⁺, Ly6C^{l+}). (13, 58, 59) Estas subpopulações de monócitos parecem estar associadas a uma ativação de macrófagos M2, entretanto esta diferenciação não está bem esclarecida.

As subpopulações de monócitos expressam alguns genes que lhes conferem diferenças fenotípicas e funcionais, como diferenças quanto à expressão de receptores para antígenos, quimiocinas e citocinas. Não há um consenso em relação às citocinas produzidas preferencialmente por cada subpopulação de monócitos.

2.3.1. ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS / MACRÓFAGOS

Os macrófagos estão assumindo um papel cada vez mais proeminente na patogênese da ES, apresentando genes associados fortemente como biomarcadores de doenças da pele e dos pulmões. (60) Durante a lesão aguda do tecido, ocorre ativação e diferenciação de monócitos circulantes e recrutamento para o local de lesão, onde atuam como macrófagos em prol do combate à inflamação e/ou infecção e promoção do reparo tecidual. Os macrófagos podem ser classificados conforme sua maturação e via de ativação. A nomenclatura atual de macrófagos é complexa e às vezes leva a confusão devido a versatilidade celular e plasticidade funcional mediada por sinais de microambiente. Nesta revisão, apresentamos uma visão geral dos dois principais subconjuntos de macrófagos, denominados de acordo com estímulos que induzem sua polarização e o perfil de citocinas que eles fornecem. (15, 16)

A divisão representativa de macrófagos como células M1 e M2, está associada ao fenótipo de ativação clássico e alternativo, baseados na nomenclatura Th1/Th2 (17) (Figura 3). Atualmente, sabe-se que existem outros perfis de macrófagos, como uma população de macrófagos reguladores que possuem funções distintas, porém, sua diferenciação não está bem definida.

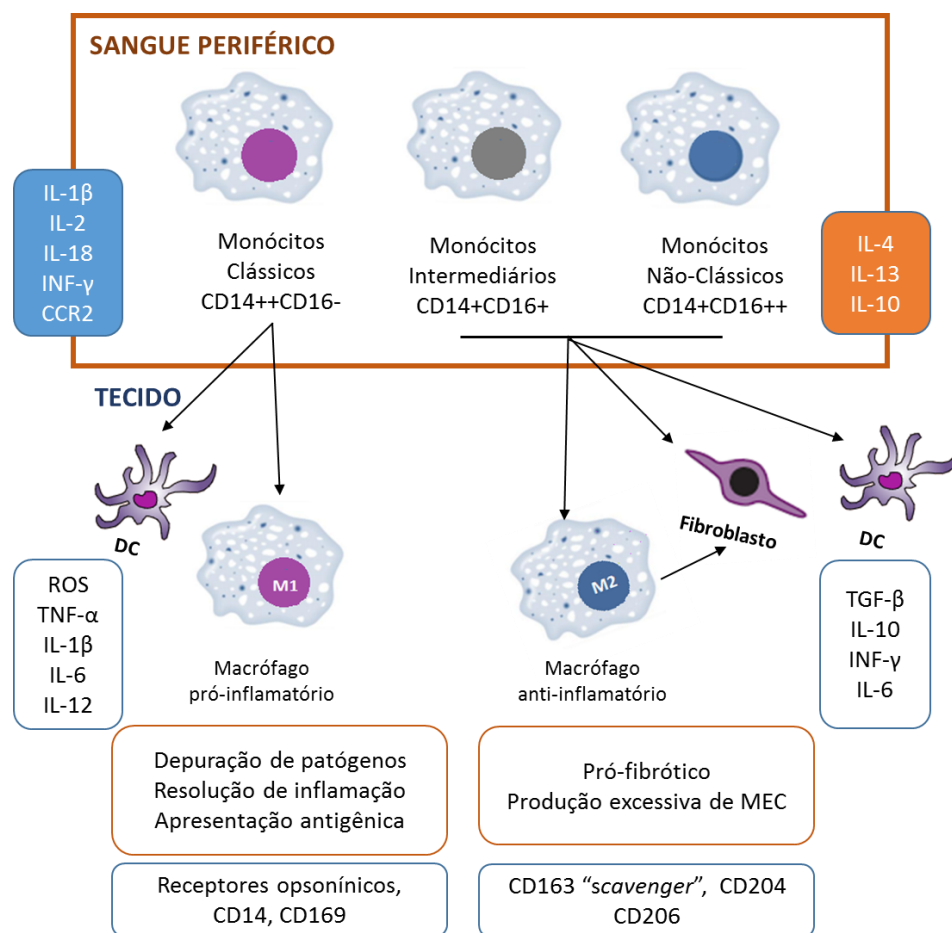


Figura 3. Esquema de ativação e diferenciação das subpopulações de monócitos/macrófagos.

Legenda= CCR2: *chemokine receptor type 2*- receptores de quimiocina tipo 2; DC: células dendríticas; IL: Interleucina; INF: Interferon; ROS: espécies reativas de oxigênio.

Fonte: elaborado pela autora (2018).

Os monócitos clássicos são rapidamente recrutados do sangue para locais de infecção e lesões, onde exibem considerável plasticidade funcional. O predomínio de citocinas como IL-1, IL-18, INF- γ e quimiocina CCR2⁺ neste microambiente, leva a diferenciação de células Th1 que secretam TNF- α , IL-2 e INF- γ , promovendo ativação do padrão M1 que expressa receptores opsonínicos (CD14, CD32, CD64) e está associado com destruição tecidual e inflamação, sendo responsável pela produção de citocinas inflamatórias, além do aumento da produção de ROS e de espécies reativas de nitrogênio. (18)

Em contrapartida, o predomínio de IL-10, IL-4 e IL-13 promove a geração de linfócitos Th2 e ativação de macrófagos pela via alternativa, monócitos não-clássicos. Há indícios de que esta subpopulação de monócitos atue como guardiões da vasculatura, patrulhando a integridade das células endoteliais com apresentação de maior expressão de

receptores CD163 “*scavenger*”, envolvidos na fagocitose, reparo tecidual e exercendo papel imunorregulador. (19-23) Portanto, macrófagos M2 diminuem o processo inflamatório através da produção de fatores anti-inflamatórios, IL-10, TGF- β e estimulam a expressão de receptores de manose (MRC1 ou CD206). (18, 24)

As principais atuações celulares da via alternativa são a ativação da endocitose, a inibição da produção de óxido nítrico e a indução da remodelação de tecidos e fibrose. Embora a arginase seja um marcador conhecido da via alternativa de ativação em ratos, não é regulada por IL-4/IL-13 em monócitos humanos, enquanto que a expressão de MRC1 é altamente induzida pela IL-4/IL-13 e assim, o MRC1 pode ser pensado como um marcador de ativação alternativa de monócitos/macrófagos em seres humanos. (15, 61, 62)

Estudos *in vitro* com diferenciação de macrófagos, verificaram que presença GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos) induz uma ativação de macrófagos M1, enquanto que presença de M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor* - fator estimulante de colônias de macrófagos) induz a ativação de M2. (22, 63)

Há fortes evidências de que os monócitos do sangue periférico são os progenitores da maior fração de macrófagos teciduais. Entretanto, é importante notar que há macrófagos residentes em tecidos que não são derivados de monócitos. Estes macrófagos residentes foram identificados em vários tecidos, incluindo cérebro, baço e pulmão. (64) Todavia a autorrenovação, proliferação, origem e mecanismos de substituição destas células não estão totalmente elucidados. (64, 65)

Não se sabe se os monócitos expressando CD16+ também contribuem para as populações de macrófagos no estado estacionário (sem presença de inflamação/infecção). Embora relatos precoces indicassem que monócitos não-clássicos se diferenciam em macrófagos alveolares em homeostase, (66) pesquisas mais recentes indicam que macrófagos alveolares são de fato derivados de monócitos com uma contribuição mínima de monócitos circulantes no sangue. (67) Portanto, ainda é uma questão em aberto a proliferação e origem dos macrófagos periféricos bem como a participação dos monócitos neste processo.

2.4. ESTUDOS AVALIANDO MARCADORES DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS NA ESCLEROSE SISTÊMICA

Esta revisão contempla os estudos que realizaram avaliação de monócitos/macrófagos em pacientes com ES, pela técnica de citometria de fluxo (CF) (tabela 3). A CF, técnica utilizada há cerca de 20 anos, é uma forma de análise específica de marcadores celulares (separador celular ativado por fluorescência - FACS). Inicialmente, com análise concomitante de dois ou quatro marcadores, hoje, é possível a distinção celular com uso de até 16 marcadores. Anterior à introdução da CF, os pesquisadores, utilizando ferramentas mais rudimentares, como ensaios enzimáticos e marcadores celulares inespecíficos, conseguiram mostrar que os monócitos circulantes estavam fortemente ativados em pacientes com ES. (68-70)

A ES apresenta intrínseca relação de autoimunidade, lesão vascular, inflamação e fibrose tecidual. Sendo que a inflamação na ES parece ser mediada, principalmente, pelos monócitos circulantes ativados que infiltram os tecidos, (71) onde podem se diferenciar em macrófagos. (10) Os macrófagos têm sido relatados como principais responsáveis pela fibrose tecidual, sendo fontes potencialmente importantes para produção de citocinas indutoras de fibroblastos que causam excessivo acúmulo de MEC e, conseqüente, fibrose tecidual. Apoiando assim, um possível papel dessas células na patogênese da doença.

Usando CF de duas cores, em um estudo piloto realizado com pequena população de pacientes com esclerose limitada e controles, Russo e col. (2006) não encontraram diferença significativa na análise de expressão de moléculas de superfície para monócitos circulantes. (72) Este estudo apresenta metodologia bastante limitada e pouca informação sobre a forma de análise.

York et al. (2007), avaliando sangue periférico e biópsia de pele, demonstraram aumento de expressão de Siglec-1 (CD169) em monócitos e macrófagos no sangue e no tecido, ainda, este aumento pode estar sendo induzido por IFN tipo I e certos TLRs (*toll-like receptors*). Estes achados sugerem que os IFNs do tipo I são reguladores importantes da expressão do gene Siglec-1 em polimorfonucleares de pacientes com ES e podem desempenhar um papel chave na ativação de monócitos nesta doença. Muito embora o aumento de expressão de Siglec1 pelos monócitos na forma difusa da ES não se correlacionou com a fibrose de pele avaliada pelo escore de Rodnan modificado. (73) As funções biológicas do CD169 nos macrófagos e monócitos ainda não estão bem elucidadas. Há indícios de que a expressão de CD169+ nos macrófagos não esteja relacionada com a função de fagocitose destas células, mas com uma possível regulação da ativação do sistema imunológico. (74) A expressão de CD169 em monócitos foi previamente identificada em pacientes com HIV onde

essa subpopulação de monócitos apresentou altos níveis de CD169, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) e receptor de quimiocina. (75)

Tabela 3. Estudos que avaliaram marcadores em monócitos/macrófagos por citometria de fluxo.

Autor	Ano	ES/ Controles (n)	Monócitos/macrófagos analisados*	Marcadores celular estudados
Ballerie et al	2018	21 ES 31 C	Sangue (cultura celular)	CD36, CD91, CD44, integrina β 5, SR-A1, SR-B1.
Trombetta et al.	2018	55 ES 27 C	Sangue periférico.	CD14 e CD45 para identificar monócitos. CD66b usado para excluir neutrófilos. M1 (CD80, CD86, TLR2 e TLR4) M2 (CD204, CD163 e CD206)
Soldano et al.	2018	58 ES 27 C	Sangue periférico	CD14, CD45, CD66b. M2- CD204, CD163, CD206. M1- CD80, CD86, TLR4, TLR2.
Lescoat et al.	2018	5 L-ES 5 C	Sangue periférico (cultura celular) Lavado broncoalveolar	CD163, CD169, CD204, CD64 e CD36
Carvalho et al.	2018	40 ES 20 C	Sangue (cultura celular)	CD14, CD3, CD19, CD56, HLA-DR, CD33. CXCL8- IL-8, CXCL10-MIP-10, CCL4- MIP-1 β , IL-6.
Lescoat et al.	2017	48 ES 23 C	Sangue periférico	CD16 (em população de monócitos).
Rademacher et al.	2016	10 ES 11 C	Sangue (cultura celular)	Expressão de CD14, ATR e ETR em células mononucleares. Concentração de CCL18 em sobrenadantes de células mononucleares pós estimulação por IgG de pacientes ES e de controles.
Mokuda et al.	2015	14 ES 9 C	Sangue (cultura celular)	CD45, CD14, CD1a, survivina, Ki-67, 7-AAD, FOXP3.
López-Cacho et al.	2014	49 ES 49 C	Sangue periférico	CD3, CD56, CD4, CD8, CD19, CD25.
Günther et al.	2014	18 ES 14 C	Sangue (cultura celular)	(Monócitos considerados CD3negD4+). Seleção de monócitos com uso de kit comercial de isolamento celular. Análise de ATR e ETR.
Binai et al.	2012	14 ES 8 C	Sangue (cultura celular)	CD14, CD11c, HLA-DR
Christmann et al.	2011	51 ES 10 C	Sangue (cultura celular)	CD14, CD206, IL-13.
Tourkina et al.	2011	13 ES 26 C	Sangue periférico e cultura celular	CD14, CD34, CD11b, CD45.
Higashi-Kuwata et al.	2010	41 ES 16 C	Sangue periférico e cultura celular	CD68, CD14, CD163, CD204.
Mathai et al.	2010	12 ES 27 C	Sangue (cultura celular)	CD45, CD14, CD34, CD68, CD163.

York et al.	2006	29 ES 11C	Sangue (cultura celular)	CD14, CD169.
Russo et al.	2006	8 L-ES 8 C	Sangue periférico	CD14, CD45; CD18, CD62L, CD11a, CD11b; TGF- β R2, M-CSF R; Fc γ RI, Fc γ RII; CD34.
Carulli et al.	2005	39 ES 12 C	Sangue (cultura celular)	CCR2, CXCR2, e CCR5.

C: controles saudáveis; ES: esclerose sistêmica; L-ES: esclerose sistêmica forma cutânea limitada; ATR: receptor de angiotensina II (angiotensin II type receptor); ETR: receptor de endotelina I (endothelin I type receptor);

* Sangue (cultura celular): se refere a análises realizadas em cultura de monócitos isolados do sangue periférico. Fonte: elaborado pela autora (2018).

Higashi-Kuwata et al. (2010), utilizaram painel mais abrangente de marcadores e avaliaram amostras de pele e sangue de pacientes com ES. Observaram que no sangue periférico havia uma população significativamente maior de células CD14+ em comparação com doadores saudáveis e que esta diferença não era vista entre os subtipos da doença. Ainda, verificaram que as células CD14+ com coexpressão de CD163+, estavam em maior número. Na pele e regiões perivasculares, observaram um número maior de células positivas para CD68 (marcador pan-macrófago), CD163 e CD204. (11) A expressão de CD163 e CD204 é associada com a diferenciação de macrófagos M2 ativados. (15) O subconjunto CD14+CD163+CD204+ de monócitos parece ser característico da ES sendo uma fonte dos macrófagos CD163+ e CD204+ encontrados na pele. Vale ressaltar que as amostras de sangue e tecido foram de pacientes e controles diferentes.

Estudos com outras metodologias, também demonstraram haver uma maior expressão de (CD163 solúvel) sCD163 no soro de pacientes com ES e que pacientes com fibrose pulmonar apresentaram níveis ainda maiores de sCD163 do que aqueles sem fibrose pulmonar. (76) Entretanto, nem todos os estudos encontraram associações entre a quantidade de CD163 e parâmetros clínicos ou laboratoriais da doença. (77) Curiosamente, foi realizada cultura de células e as dosagens de concentrações de sCD163 em sobrenadante de cultura de células foram significativamente maiores em pacientes com ES que sofreram posterior progressão da doença, em comparação com pacientes com ES com o curso da doença estável ao longo de um período de acompanhamento. Fato este que levou os pesquisadores a conclusão de que a produção de CD163 *in vitro* poderia servir como um novo biomarcador de progressão da doença. (77) Corroborando com este achado, outro estudo demonstrou que CD163 está correlacionado com fibrose de pele, avaliada pelo escore de Rodnan. (78)

Com base na hipótese de que os monócitos circulantes são fonte para os macrófagos teciduais pró-fibróticos, Mathai et al. (2010) avaliaram sangue de pacientes com DIP onde observaram que os monócitos CD14+ expressam níveis mais altos de CD163 em comparação

aos controles, o que confere a estas células uma atividade pró-fibrótica semelhante aos macrófagos tipo M2 e que a concentração de células produtoras de colágeno (considerado como fibrócitos CD34+ CD14+, diferenciadas a partir de monócitos) também estava aumentada nestes pacientes com ES-DIP. Em busca de mais subsídios para esta hipótese, realizaram cultura destas células com estimulação por LPS (*lipopolysaccharide*) e verificaram um aumento ainda maior da expressão de CD163 em células CD14+ destes pacientes. (79)

Além da DIP, os monócitos e macrófagos parecem estar associados a outras complicações como a HAP. Chistmann et al. (2011) demonstraram que monócitos/macrófagos CD14+ apresentavam forte expressão dos genes CCR1 (*C-C motif chemokine receptor 1*) e JAK2 em pacientes com ES-HAP comparados aos controles e que a expressão de CD206, considerado um marcador de ativação alternativa de monócitos/macrófagos M2, está correlacionada com pressão arterial pulmonar e mortalidade na ES, com maior expressão em ES limitada e ES-HAP e que estes pacientes apresentam maior concentração de IL-13 no plasma. (80) CCR1 é um receptor de quimiocina alvo de citocinas Th2 liberadas por macrófagos sobre a estimulação de IL-13 ou IL-4 e essencial na mediação da inflamação induzida por IL-13; (81) JAK2 é uma proteína sinalizadora intracelular também ativada por IL-13. Os marcadores M2 encontrados neste grupo de pacientes podem ser reflexo de ativação Th2 no sangue, apresentando aumento de secreção de mediadores pró-fibróticos e anti-inflamatórios, (80) como visto por Rademacher et al. (2016) através do aumento de secreção da citocina CCL18 por monócitos associados a fibrose pulmonar e pacientes com alto escore cutâneo de Rodnan modificado; (50) reforçando argumentos de que os monócitos poderiam desempenhar um papel chave na patogênese de distúrbios autoimunes. Estes achados de monócitos com perfil M2 podem ser considerados uma assinatura de monócitos em pacientes com ES, principalmente com acometimento pulmonar, demonstrado pela expressão de CD14, CD68, CD204 e Siglec-1. (11, 73, 79, 80)

Mokuda et al. (2015) revelaram que os monócitos (CD45+ CD14+) de pacientes com ES apresentavam níveis maiores de anticorpo anti-survivina do que os indivíduos saudáveis. (82) A survivina é um membro da família de proteínas inibidoras da apoptose e que desempenha um papel crucial na divisão celular e apoptose, é especialmente expressa durante o desenvolvimento embrionário normal e tem atraído a atenção como um potencial alvo para a terapia do câncer. (83) Este estudo comparou expressão de marcadores de células do sangue e de tecido e sugeriu que a infiltração dérmica por células survivina+ e com expressão de CD1a+ pode corresponder a células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico, podendo a survivina ser uma molécula envolvida na patogênese da ES. (82)

O CD14 é principalmente expresso por monócitos e macrófagos, embora também possa ser encontrado em níveis e quantidades de expressão mais baixos em células dendríticas e fibroblastos (células não mieloides encontradas nos tecidos). (79, 80, 84) Binai et al. (2012) observaram *in vitro* que monócitos de pacientes com ES podem apresentar um potencial de diferenciação em células semelhantes a miofibroblastos, inclusive com diminuição de expressão de CD14+, quando estimulados por GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), endotelina (*Endothelin-1*) e IL-4. Viram que estas células passaram a apresentar níveis mais elevados de HLA-DR e CD11c, além de uma progressiva perda de expressão de CD14. (84) Entretanto, este estudo não avaliou a expressão de outros marcadores, como por exemplo o CD16, que mostra que o processo de diferenciação de monócitos em miofibroblastos nas condições testadas não está completo e que esta elucidação pode requerer outras estimulações ou até mesmo diferenciação *in vivo* que ajudariam a distinguir com mais clareza as células envolvidas na fibrose.

Os monócitos podem ser separados em subpopulações conforme a expressão de alguns marcadores de superfície celular, conforme a presença e intensidade de expressão, por exemplo de CD14 e CD16. Lescoat et al. (2017), foram o primeiro grupo a diferenciar subpopulações de monócitos em pacientes com ES conforme expressão de CD14 e CD16 e associar estes achados com manifestações clínicas da doença. A contagem absoluta da subpopulação CD16+ foi correlacionada com a severidade da fibrose tecidual, avaliada pelo escore de Rodnan, e também foi associada a fibrose pulmonar, avaliada pela capacidade pulmonar total e com a capacidade de difusão pulmonar de monóxido de carbono. (8) Sugerindo que, o aumento do número de monócitos CD16+ no sangue de pacientes com ES poderia estar relacionado com o acúmulo de macrófagos M2 nos tecidos, responsáveis pela fibrose.

Em um complexo estudo, Soldano et al. (2018), utilizaram uma ampla gama de marcadores de superfície para diferenciar perfil M1 e M2 de monócitos/macrófagos circulantes. O estudo demonstrou não haver diferença de percentual de células M1 entre pacientes e indivíduos saudáveis. (85) O mesmo grupo (Trombeta, 2018) demonstrou que, pacientes com ES, apresentam um aumento de monócitos circulantes com um perfil misto de M1/M2, e expressão variada de marcadores de ambos os grupos (CD204+ CD163+ CD206+ TLR4+ CD80+ CD86+ e CD14+ CD206+ CD163+ CD204+ TLR4+ CD80+ CD86+). Este aumento de M1/M2 foi associado com acometimentos pulmonares, como doença intersticial pulmonar e maior pressão arterial pulmonar sistólica, além de uma associação com anticorpo anti-topoisomerase, um conhecido marcador preditor de envolvimento pulmonar. (86)

Semelhante expressão mista foi vista por Lescoat et al. (2018), que demonstraram um fenótipo misto de expressão celular M1/M2 para os monócitos/macrófagos circulantes em pacientes com ES. Ainda, confirmaram que o uso de M-CSF *in vitro* auxilia para diferenciar macrófagos derivados de monócitos semelhantes aos macrófagos alveolares em suas desordens fibróticas, de perfil M2. (63) O mesmo grupo, em outro estudo, observou defeitos na eferocitose de macrófagos derivados de monócitos, em pacientes com ES, sendo uma forma de participação da patogênese da autoimunidade e fibrose via aumento da liberação de antígeno com subsequente formação de imuno complexos. Sendo mais um fator que contribui para confirmação da participação dos monócitos/macrófagos na patogênese da ES. (87)

Atualmente, é bem aceito que os monócitos representam uma população de células heterogêneas no sangue, onde é possível distinguir subconjuntos de monócitos clássicos e não-clássicos. (13) A heterogeneidade dos monócitos do sangue e suas funções descritas anteriormente sugerem que cada subpopulação poderia desempenhar um papel diferente durante a homeostase e nas condições de doença. Entretanto, muitos dos estudos afirmam relação direta de monocitose e aumento de fibrose pulmonar e/ou presença de doença pulmonar. (8, 80, 85, 86, 88)

Há fortes evidências de que os monócitos do sangue periférico são os progenitores da maior fração de macrófagos teciduais. Entretanto, é importante notar que há macrófagos residentes em tecidos que não são derivados de monócitos, e sua autorrenovação, proliferação, origem e mecanismos de substituição não foram totalmente elucidados. (64, 65) Recentemente, Davies e colaboradores em uma extensa análise, relataram a coexistência de macrófagos de origem dependente e independente de monócitos no sangue e em vários tecidos, incluindo cérebro, baço e pulmão, e definiram os fenótipos e funções celulares desses macrófagos residentes no tecido. (64) Como a população de macrófagos residentes é autorrenovável, ainda é uma questão em aberto a proliferação de macrófagos periféricos.

Sabe-se que monócitos do sangue são heterogêneos em termos de sua expressão de moléculas-chave, receptores de quimiocinas e moléculas de adesão celular, que determinam exatamente como eles vão responder a estímulos quando recrutados para os tecidos. Ainda carece de esclarecimento a extensão em que os subgrupos de monócitos podem ser subdivididos, considerando suas funções efectoras, os destinos e estímulos teciduais.

Esta revisão sistemática evidenciou que há uma dificuldade consensual em caracterizar as células estudadas pois, os diferentes grupos utilizam nomenclaturas e marcadores celulares distintos. Não há estudos disponíveis que comparam diferentes subpopulações de monócitos,

não há estudos que compararam marcadores de monócitos precursores de macrófagos circulantes com macrófagos de pele e de infiltrado pulmonar, por exemplo.

3. MARCO TEÓRICO

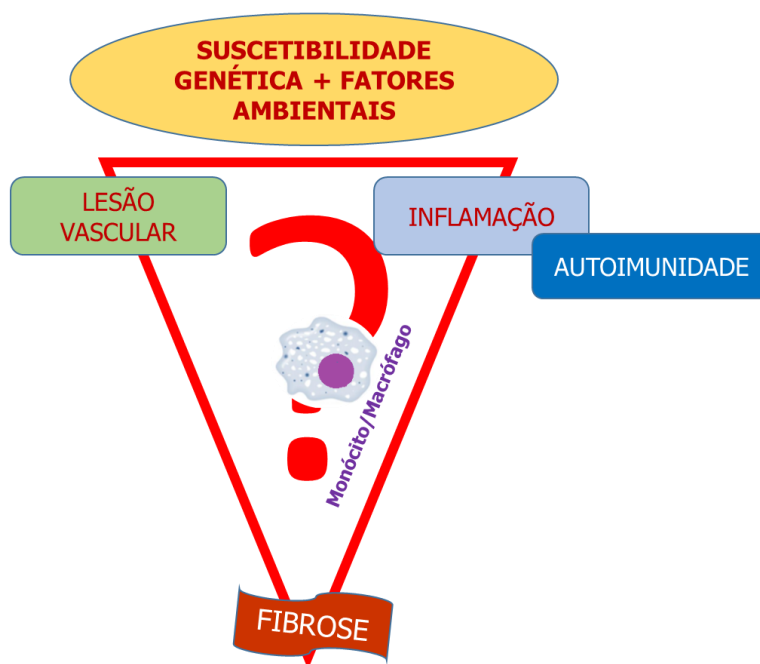


Figura 4. Esquema representativo de marco teórico.

Fonte: elaborado pela autora (2018).

Os mecanismos responsáveis pelo início da autoimunidade e o papel das vias efetoras imunes na patogênese da esclerose sistêmica permanecem incompletamente compreendidos. A etiologia complexa envolve interação de fatores genéticos, ambientais e étnicos, desempenhando papel crítico nas manifestações da doença. Os mecanismos que desencadeiam ou perpetuam o fenótipo da doença ainda não foram totalmente elucidados, há hipótese de envolvimento de distúrbios da imunidade influenciando no desencadeamento. Acredita-se que fatores pró-inflamatórios e/ou pró-fibróticos sejam produzidos ou ativados por células do sistema imune inato, principalmente monócitos e macrófagos. Portanto, evidenciar receptores diferenciados em células de pacientes com ES, envolvidos em mecanismos que modulam inflamação e fibrose mediada por monócitos circulantes e macrófagos, pode proporcionar oportunidades terapêuticas para tratar a ES nos estágios mais iniciais da doença.

4. JUSTIFICATIVA

ES é uma doença autoimune sistêmica que causa grande perda funcional e de qualidade de vida com aumento de mortalidade. Sua fisiopatologia inclui diversos agentes que participam de forma inter-relacionada. O diagnóstico carece de biomarcadores e não há tratamento que tenha efeito modificador do curso de doença. Neste cenário, tem-se buscado maior compreensão sobre a fisiopatologia da doença, com perspectivas para o diagnóstico precoce e tratamento mais efetivo e personalizado, com o uso de terapias específicas para alvos moleculares e avaliação de biomarcadores preditivos.

Os monócitos e macrófagos passaram a ser alvo de estudos mais recentes devido a sua plasticidade e participação em processos fibróticos, sendo descritos como divididos em subpopulações que apresentam perfil de atuação diferenciado. Portanto, há necessidade de clarificação quanto a diferenciação de subpopulações de monócitos que atuam como macrófagos nos tecidos e a participação destas células na ES. Apesar de relatos de que pacientes com ES apresentam aumento de monócitos circulantes, a distinção de qual subpopulação desta célula está atuante na doença é primordial. A identificação das subpopulações de monócitos/macrófagos pode vir a auxiliar no diagnóstico precoce, no desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas alvo-específicas e ser indicativo prognóstico para pacientes com ES, bem como ter utilidade na avaliação da eficácia do tratamento.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVOS GERAIS

Estudar marcadores de monócitos/macrófagos no sangue periférico de pacientes com esclerose sistêmica.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diferenciar os monócitos/macrófagos em três subpopulações conforme a expressão de CD14 e CD16.
- Estudar a expressão dos biomarcadores HLA-DR, CD206 (*Mannose receptor-1* ou MRC1), CD163, CD169 (*Sialoadhesin-9*) nas subpopulações de monócitos/macrófagos.
- Avaliar possíveis associações entre as subpopulações de monócitos/macrófagos estudados e as variáveis clínicas da ES.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Varga J. Diagnosis and differential diagnosis of systemic sclerosis (scleroderma) in adults UpToDate2017 [
2. Medsger TA, Bombardieri S, Czirjak L, Scorza R, Della Rossa A, Bencivelli W. Assessment of disease severity and prognosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2003;21(3 Suppl 29):S42-6.
3. Firestein GS BR, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Vol. Elsevier e, editor. Philadelphia.: Elsevier; 2013.
4. Murdaca G, Contatore M, Gulli R, Mandich P, Puppo F. Genetic factors and systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2016;15(5):427-32.
5. Gelber AC, Manno RL, Shah AA, Woods A, Le EN, Boin F, et al. Race and association with disease manifestations and mortality in scleroderma: a 20-year experience at the Johns Hopkins Scleroderma Center and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2013;92(4):191-205.
6. Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(6):1017-26.
7. Stifano G, Christmann RB. Macrophage Involvement in Systemic Sclerosis: Do We Need More Evidence? *Curr Rheumatol Rep*. 2016;18(1):2.
8. Lescoat A, Lecureur V, Roussel M, Sunnaram BL, Ballerie A, Coiffier G, et al. CD16-positive circulating monocytes and fibrotic manifestations of systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2017;36(7):1649-54.
9. Soldano S, Pizzorni C, Paolino S, Trombetta AC, Montagna P, Brizzolara R, et al. Alternatively Activated (M2) Macrophage Phenotype Is Inducible by Endothelin-1 in Cultured Human Macrophages. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166433.
10. Kråling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology*. 1995;63(1):48-56.
11. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, et al. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R128.
12. Brunasso AM, Massone C. Update on the pathogenesis of Scleroderma: focus on circulating progenitor cells. *F1000Res*. 2016;5.
13. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
14. Dantas AT, Almeida AR, Sampaio MCPD, Cordeiro MF, Oliveira PSS, Mariz HA, et al. Different profile of cytokine production in patients with systemic sclerosis and association with clinical manifestations. *Immunol Lett*. 2018;198:12-6.
15. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:451-83.
16. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
17. Kodolja V, Müller C, Politz O, Hakij N, Orfanos CE, Goerdt S. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol*. 1998;160(3):1411-8.

18. Mandal P, Pratt BT, Barnes M, McMullen MR, Nagy LE. Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. *J Biol Chem*. 2011;286(15):13460-9.
19. Laresgoiti-Servitje E, Gómez-López N, Olson DM. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. *Hum Reprod Update*. 2010;16(5):510-24.
20. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.
21. Fleming BD, Mosser DM. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol*. 2011;41(9):2498-502.
22. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
23. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001;409(6817):198-201.
24. Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, Yeremenko N, et al. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(4):966-75.
25. Kanakoudi-Tsakalidou F, Debonera F, Drossou-Agakidou V, Sarafidis K, Tzimouli V, Taparkou A, et al. Flow cytometric measurement of HLA-DR expression on circulating monocytes in healthy and sick neonates using monocyte negative selection. *Clin Exp Immunol*. 2001;123(3):402-7.
26. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(11):1747-55.
27. Steen VD, Medsger TA. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2000;43(11):2437-44.
28. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009;360(19):1989-2003.
29. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15(2):202-5.
30. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(2):165-70.
31. Mayes MD. Scleroderma epidemiology. *Rheum Dis Clin North Am*. 2003;29(2):239-54.
32. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum*. 2001;44(6):1359-62.
33. Horimoto AMC, Matos ENN, Costa MRD, Takahashi F, Rezende MC, Kanomata LB, et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2017;57(2):107-14.
34. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*. 2007;117(3):557-67.
35. Trojanowska M, Varga J. Molecular pathways as novel therapeutic targets in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19(6):568-73.
36. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15002.
37. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet*. 2017;390(10103):1685-99.

38. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:509-37.
39. Tamoutounour S, Guillemins M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, et al. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity.* 2013;39(5):925-38.
40. Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med.* 2004;140(1):37-50.
41. Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, Mouthon L. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2003;2(3):152-7.
42. Zimmermann AF, Pizzichini MM. Update on etiopathogenesis of systemic sclerosis. *Rev Bras Reumatol.* 2013;53(6):516-24.
43. Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(3):134-44.
44. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1980;23(5):581-90.
45. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001;28(7):1573-6.
46. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2737-47.
47. Steen VD, Mayes MD, Merkel PA. Assessment of kidney involvement. *Clin Exp Rheumatol.* 2003;21(3 Suppl 29):S29-31.
48. Hax V, Bredemeier M, Didonet Moro AL, Pavan TR, Vieira MV, Pitrez EH, et al. Clinical algorithms for the diagnosis and prognosis of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2017;47(2):228-34.
49. Rice LM, Stifano G, Ziemek J, Lafyatis R. Local skin gene expression reflects both local and systemic skin disease in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2015.
50. Rademacher J, Kill A, Mattat K, Dragun D, Siegert E, Günther J, et al. Monocytic Angiotensin and Endothelin Receptor Imbalance Modulate Secretion of the Profibrotic Chemokine Ligand 18. *J Rheumatol.* 2016;43(3):587-91.
51. Arruda LCM, Malmegrim KCR, Lima-Júnior JR, Clave E, Dias JBE, Moraes DA, et al. Immune rebound associates with a favorable clinical response to autologous HSCT in systemic sclerosis patients. *Blood Adv.* 2018;2(2):126-41.
52. Helbig G, Widuchowska M, Kocłęga A, Kopińska A, Kopeć-Mędrek M, Gawęł WB, et al. Safety profile of autologous hematopoietic stem cell mobilization and transplantation in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2018;37(6):1709-14.
53. Sullivan KM, Goldmuntz EA, Furst DE. Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N Engl J Med.* 2018;378(11):1066-7.
54. Henes JC, Koetter I, Horger M, Schmalzing M, Mueller K, Eick C, et al. Autologous stem cell transplantation with thiotepa-based conditioning in patients with systemic sclerosis and cardiac manifestations. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(5):919-22.
55. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab.* 2012;15(4):432-7.
56. Gentek R, Molawi K, Sieweke MH. Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol Rev.* 2014;262(1):56-73.
57. Haniffa M, Collin M, Ginhoux F. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv Immunol.* 2013;120:1-49.

58. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One*. 2010;5(6):e11049.
59. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014;5:514.
60. Stifano G, Affandi AJ, Mathes AL, Rice LM, Nakerakanti S, Nazari B, et al. Chronic Toll-like receptor 4 stimulation in skin induces inflammation, macrophage activation, transforming growth factor beta signature gene expression, and fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(4):R136.
61. Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood*. 2014;123(20):e110-22.
62. Martinez FO. Regulators of macrophage activation. *Eur J Immunol*. 2011;41(6):1531-4.
63. Lescoat A, Ballerie A, Augagneur Y, Morzadec C, Vernhet L, Fardel O, et al. Distinct Properties of Human M-CSF and GM-CSF Monocyte-Derived Macrophages to Simulate Pathological Lung Conditions In Vitro: Application to Systemic and Inflammatory Disorders with Pulmonary Involvement. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).
64. Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology*. 2015;144(4):541-8.
65. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013;14(10):986-95.
66. Landsman L, Jung S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol*. 2007;179(6):3488-94.
67. Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med*. 2013;210(10):1977-92.
68. Hussein MR, Hassan HI, Hofny ER, Elkholly M, Fatehy NA, Abd Elmoniem AE, et al. Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. *J Clin Pathol*. 2005;58(2):178-84.
69. López-Cacho JM, Gallardo S, Posada M, Aguerri M, Calzada D, Mayayo T, et al. Association of immunological cell profiles with specific clinical phenotypes of scleroderma disease. *Biomed Res Int*. 2014;2014:148293.
70. Carulli MT, Ong VH, Ponticos M, Shiwen X, Abraham DJ, Black CM, et al. Chemokine receptor CCR2 expression by systemic sclerosis fibroblasts: evidence for autocrine regulation of myofibroblast differentiation. *Arthritis Rheum*. 2005;52(12):3772-82.
71. Andrews BS, Friou GJ, Berman MA, Sandborg CI, Mirick GR, Cesario TC. Changes in circulating monocytes in patients with progressive systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1987;14(5):930-5.
72. Russo R, Medbury H, Guiffre A, Englert H, Manolios N. Lack of increased expression of cell surface markers for circulating fibrocyte progenitors in limited scleroderma. *Clin Rheumatol*. 2007;26(7):1136-41.
73. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum*. 2007;56(3):1010-20.
74. Oetke C, Vinson MC, Jones C, Crocker PR. Sialoadhesin-deficient mice exhibit subtle changes in B- and T-cell populations and reduced immunoglobulin M levels. *Mol Cell Biol*. 2006;26(4):1549-57.

75. Pulliam L, Sun B, Rempel H. Invasive chronic inflammatory monocyte phenotype in subjects with high HIV-1 viral load. *J Neuroimmunol.* 2004;157(1-2):93-8.
76. Shimizu K, Ogawa F, Yoshizaki A, Akiyama Y, Kuwatsuka Y, Okazaki S, et al. Increased serum levels of soluble CD163 in patients with scleroderma. *Clin Rheumatol.* 2012;31(7):1059-64.
77. Bielecki M, Kowal K, Lapinska A, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O. Increased release of soluble CD163 by the peripheral blood mononuclear cells is associated with worse prognosis in patients with systemic sclerosis. *Adv Med Sci.* 2013;58(1):126-33.
78. Rice LM, Ziemek J, Stratton EA, McLaughlin SR, Padilla CM, Mathes AL, et al. A longitudinal biomarker for the extent of skin disease in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(11):3004-15.
79. Mathai SK, Gulati M, Peng X, Russell TR, Shaw AC, Rubinowitz AN, et al. Circulating monocytes from systemic sclerosis patients with interstitial lung disease show an enhanced profibrotic phenotype. *Lab Invest.* 2010;90(6):812-23.
80. Christmann RB, Hayes E, Pendergrass S, Padilla C, Farina G, Affandi AJ, et al. Interferon and alternative activation of monocyte/macrophages in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum.* 2011;63(6):1718-28.
81. Ninichuk V, Anders HJ. Chemokine receptor CCR1: a new target for progressive kidney disease. *Am J Nephrol.* 2005;25(4):365-72.
82. Mokuda S, Miyazaki T, Ubara Y, Kanno M, Sugiyama E, Takasugi K, et al. CD1a+ survivin+ dendritic cell infiltration in dermal lesions of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:275.
83. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res.* 2015;141(4):389-97.
84. Binai N, O'Reilly S, Griffiths B, van Laar JM, Hügler T. Differentiation potential of CD14+ monocytes into myofibroblasts in patients with systemic sclerosis. *PLoS One.* 2012;7(3):e33508.
85. Soldano S, Trombetta AC, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Brizzolara R, et al. Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2018.
86. Trombetta AC, Soldano S, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Paolino S, et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir Res.* 2018;19(1):186.
87. Ballerie A, Lescoat A, Augagneur Y, Lelong M, Morzadec C, Cazalets C, et al. Efferocytosis capacities of blood monocyte-derived macrophages in systemic sclerosis. *Immunol Cell Biol.* 2018.
88. Tourkina E, Bonner M, Oates J, Hofbauer A, Richard M, Znoyko S, et al. Altered monocyte and fibrocyte phenotype and function in scleroderma interstitial lung disease: reversal by caveolin-1 scaffolding domain peptide. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011;4(1):15.

7. ARTIGO ORIGINAL

Original article

CD14/CD16 MONOCYTE SUBPOPULATIONS IN SYSTEMIC SCLEROSIS

**Schneider L.^{1,2}, Marcondes N.A.³, Hax V.¹, Moreira I.⁴, Ueda C.⁴, Romeiro R.⁴,
Xavier R.^{1,2}, Chakr R.^{1,2}**

1. Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2. Post Graduation Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

3. Laboratório Zanol, Porto Alegre, Brazil

4. Undergraduate medical student, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to: Laiana Schneider - Rheumatology Division - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS. 2350 Ramiro Barcelos St, Room 645, Zip code: 90035-903. Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55-51-33313834. E-mail: laia_schneider@hotmail.com

Ethical aspects

This study was approved by the Research Ethics Committee of the institution (CAAE number: 49299515.0.0000.5327) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and current laws in Brazil. Participants were included after written informed consent.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

ABSTRACT

Background: systemic sclerosis (SSc) is a chronic autoimmune disease characterized by vasculopathy and fibrosis, which can be subclassified into diffuse cutaneous (dSSc) and limited cutaneous (lSSc) subtypes. Previous studies suggest that an increase in monocytes can be a hallmark of various inflammatory diseases, including SSc. Our aim was to evaluate circulating blood monocyte subpopulations (classical, intermediate and non-classical) and their possible association with disease manifestations.

Methods: fifty consecutive patients fulfilling the 2013 ACR/EULAR classification criteria for SSc were included in a cross-sectional study. Monocyte subpopulations were identified based on their CD14 and CD16 surface expression, evaluated with flow cytometry, and were correlated with patients' clinical characteristics. Thirty-eight age- and sex-matched healthy individuals were recruited as a control group.

Results: SSc patients had an increased number of circulating peripheral blood monocytes compared to healthy subjects. Absolute counts of CD16+ (intermediary and non-classical) monocyte subpopulations were higher in SSc patients. lSSc subjects showed greater forced vital capacity than dSSc patients. There was no association between monocyte subpopulations and any clinical manifestation.

Conclusion: we identified higher counts of all monocyte subpopulations in SSc patients, with an activated phenotypic profile as compared to control group. There was no association between monocyte subpopulations and major fibrotic manifestations. CD169 appears to be more representative marker for dSSc subtype.

Key-words: systemic sclerosis; monocytes; monocyte subpopulations.

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic inflammatory systemic disease, mainly characterized by expansion of the secondary extracellular matrix due to an exaggerated protein production, especially collagen. Collagen is deposited as a result of the abnormal interaction between endothelial cells, mononuclear cells (lymphocytes and monocytes) and fibroblasts. Monocytes express several receptors, which monitor and detect environmental changes. Those cells present great plasticity and heterogeneity and have the ability to modify their functional phenotype in response to stimulation. (1) There seems to be a relationship between the monocytes/macrophages activation and migration, (2, 3) and SSc pathogenesis. (4)

Evidences from human and murine studies suggest that an increase in monocytes can be an indicator of various inflammatory diseases and that these cells could differentiate into inflammatory or anti-inflammatory subgroups. (5) For almost two decades studies have shown the presence of two subsets of cells: classical and non-classical monocytes. Classical monocytes, characterized by expression of CD14⁺⁺CD16⁻, represent about 80% of all monocytes and have phagocytic function, with production of reactive oxygen species and secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines in response to agonist stimulation of toll-like receptor-4 (TLR-4). (6) The non-classical monocytes, which express CD16⁺, have a higher activity in response to viruses and produce proinflammatory cytokines through TLR-8 and TLR-9, (7, 8) resembling "resident" tissue macrophages with higher MHC II expression. (9) The differences between these monocyte subsets have been made clear, with distinct phenotypes and different functions, such as defense against pathogens, homeostasis and tissue repair. (10-12)

In recent years, a third group of monocytes has been proposed, dividing the CD16⁺ population into non-classical and intermediate monocytes (respectively, CD14^{+/-}CD16⁺⁺ and CD14⁺CD16⁺). (8, 11, 12) These CD16⁺ monocytes appear to be related to alternative activated M2 macrophages, and their activation pathway showed that they are associated with T helper (Th) 2 response. (5, 13) Evaluation of mannose receptor-1 (MRC1 or CD206) and CD163 (macrophage scavenger receptors) that are typical of M2 macrophage activation pathway, showed an association of these markers with tissue repair and fibrosis, (14) and in SSc patients those markers are associated with high pulmonary artery pressure and increased mortality. (15) Other marker that may play a key role in the monocyte activation present in SSc is CD169 (Sialic acid-binding Ig-like lectine I or Siglec-1), also known as sialoadhesin, which has been shown to have a higher expression in a subset of SSc patients monocytes. (16)

Monocytes of SSc patients have a greater expression of these molecules, that are even higher in patients with tissue disease and pulmonary artery hypertension.

Peripheral blood monocytes heterogeneity still lacks a clear comprehension of its role in SSc pathophysiology and clinical manifestations. The aim of our study was to characterize the three monocytes subpopulations of SSc patients, analyze the expression of CD163, CD169, CD206 and HLA-DR (function and activation monocytes receptors), and their association with clinical findings.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Fifty consecutive patients fulfilling the 2013 ACR/EULAR classification criteria for SSc (17) were recruited from the Outpatient Rheumatology Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Clinical form of disease was classified as diffuse SSc (dSSc) or limited SSc (lSSc) according to the revised classification of LeROY. (18, 19) Patients receiving immunosuppressive drugs for SSc at the time of inclusion were carefully evaluated since those medications can influence monocytes counts and function. (11) Only patients that received cyclophosphamide treatment at least six months prior to the interview were included. Medications under use were obtained from medical records and confirmed during medical appointments. Disease duration was defined as the time interval since the onset of Raynaud's phenomenon or skin symptoms (whichever came first). Severity of skin involvement was assessed using the modified Rodnan skin score. (20) Laboratory test results including serology, presence of autoantibodies and pulmonary function tests such as assessment of lung diffusion capacity for carbon monoxide (DLCO) and forced vital capacity (FVC) performed in the period of three months before or after the peripheral blood sample collection were obtained in medical records. Patients with scleroderma in overlap syndrome with other connective tissue disease and infectious diseases (HIV, hepatitis C or B) were excluded.

Controls

Thirty-eight subjects age- and sex-matched to the SSc patients, with no previous history of autoimmune or hematological diseases and a normal complete blood cell (CBC) count (hemoglobin >11.0 g/dl; white blood cells $>4 \times 10^3/\text{mm}^3$ and $<12 \times 10^3/\text{mm}^3$; and platelets $>150 \times 10^3/\text{mm}^3$) were recruited from a local blood donation center and at a Primary Health Care Service unit. The criteria for inclusion were the same as those used in blood donation,

including the absence of autoimmune diseases, current infections, cancer and immunosuppressive drug treatment.

Study design

This was a monocentric cross-sectional study carried out from October, 2016, to May, 2017.

Flow cytometry protocol

Peripheral blood samples were collected in EDTA coated tubes from SSc and healthy control (HC) patients. CBC was performed in a Sysmex XE-2100™ (Sysmex, Kobe, JPN) hematological counter and the total amount of peripheral blood monocytes was determined.

Flow cytometry immunophenotyping (FCI) to identify and characterize monocyte subpopulations was performed less than 4 hours after blood sampling. About 1,000,000 cells were placed into polystyrene tubes and were subjected to surface staining by incubation with titrated amounts of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (MoAbs) against CD14 APC-H7 (clone MφP9), CD64 BV421 (clone 10.1), CD16 BV510 (clone 3G8), HLA-DR PERCP-Cy5.5 (clone G46-6), CD206 APC (clone 19.2), CD169 BB515 (clone 7-239) and CD163 PE (clone GHI/61) for 30 minutes at room temperature and protected from light. All MoAbs were purchased from BD Biosciences (San Diego, USA). Red blood cells were lysed by incubation with 2 ml of lysing buffer (BD Biosciences) for 10 minutes. Samples were washed and resuspended in phosphate buffered saline (PBS). At least 30,000 gated monocytes were acquired in an 8-color BD FACSCanto™ II flow cytometer (BD Biosciences) using FACSDiva™ software (BD Biosciences). Flow cytometer technical parameters (voltage, spectral overlap compensation) were automatically set with BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Biosciences). Daily internal quality control (QC) was performed with IMMUNO-TROL Cells (BD Biosciences).

Phenotypic analysis of monocyte subpopulations

Figure 1 shows the gating strategy used. Initially, doublets were excluded and total nucleated cells were selected based on FSC (forward scatter) versus SSC (side scatter) distribution. Monocytes were gated based on cell size and complexity, as well as CD64⁺⁺ expression, and were plotted in a CD14 versus CD16 graph in order to characterize all three monocyte subpopulations: classical monocytes (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate monocytes (CD14⁺⁺CD16⁺) and non-classical monocytes (CD14^{+/-}CD16⁺⁺). Fluorescence-minus-one (FMO) methodology was used to differentiate autofluorescent events from events with low

concentrations of cell surface markers (21) (Figure 1). All values obtained in this analysis were considered FMO limit and all values of fluorescence above the limit were considered as true positive. Percentage of expression and mean fluorescence intensity (MFI) of any given marker within the defined monocyte subpopulation were recorded. All FCI data were analyzed using Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA) by two experienced operators concomitantly.

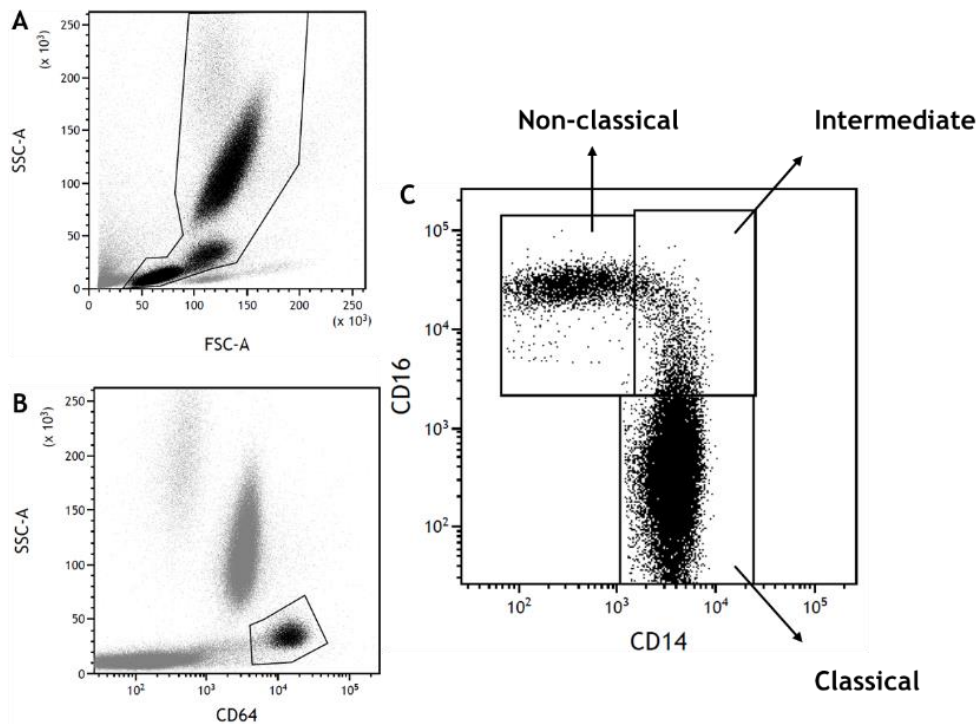


Figure 1. Identification of monocyte subpopulations. Plot A- Cells were gated based on FSC (forward scatter) versus SSC (side scatter) distribution and doublets were excluded. Plot B- Monocytes were gated based on cell size and complexity, as well as CD64⁺⁺ expression. Plot C- Monocytes subpopulations were plotted in a CD14 versus CD16 expression in a representative healthy control.

Statistical analysis

The sample size was calculated based on the literature. (14, 22) It was necessary 46 participants to estimate a correlation between laboratory and clinical variables studied, with coefficient equal to 0.3, considering a power of 80% and a significance of 5%. The higher the correlation coefficient, the smaller the number of observations (or samples) needed to determine the association between the variables. We used the Winpepi program for this estimate.

Variables distribution was analyzed by Shapiro-Wilk's test and continuous variables were compared by Student's T or Mann-Whitney's U test, whereas proportions were compared by Pearson's chi-square or Fisher's exact test. ANOVA or Kruskal-Wallis, with a Tukey or Dunn

correction test was used for multiple comparisons. Pearson or Spearman correlation test was used to evaluate association between variables. The statistical significance level adopted was 5% ($p < 0.05$). Data analysis was carried out with SPSS version 21.0[®] (IBM, Chicago, USA) and Prisma8 software (Graphpad Inc. San Diego, USA).

RESULTS

Patients and controls characteristics

Demographic data and clinical characteristics of SSc and HC subjects are shown in Table 1. SSc patients mean age was 57.2 years and 94% were female. Limited form of disease was present in 72% of SSc patients. Median Rodnan skin score was 5 (2.0-8.0) in lSSc patients and 11 (3.8-16.8) in the dSSc patients ($p = 0.007$). Pulmonary function also differed among disease subgroups when comparing forced vital capacity (FVC% predicted) results: lSSc subjects had higher mean values when compared to dSSc patients ($83.8 \pm 17.4\%$ versus $67.5 \pm 18.2\%$, $p = 0.005$).

Table 1. Demographic, clinical, and laboratory features of SSc patients and controls.

	SSc patients n=50 (%)	Controls n=38 (%)
Female gender	47 (94.0)	36 (94.7) ^a
Age (years)	57.2 ± 12.8	55.2 ± 11.4 ^b
European-derived	40 (80)	24 (68.6)
Smoking status		
Never	25 (50)	23 (65.7)
Previous	21 (42)	30 (29.7)
Current	4 (8)	2 (5.7)
Disease duration (years)	15 (7-21)	
Diffuse cutaneous involvement	14 (28.0)	
Modified Rodnan skin core	6 (2.8-10.3)	
Previous scleroderma renal crisis	4 (8.0)	
Gastrointestinal symptoms		
Heartburn	25 (50.0)	
Dysphagia	26 (52.0)	
Diarrhea / constipation	21 (42.0)	
DLCOc (% predicted)	70.1 ± 16.3	
Reduced DLCOc (<80% predicted) (n=33)	52.9 ± 12.6	
FVC (% predicted)	79.2 ± 18.9	
Reduced FVC (<80% of predicted) (n=22)	61.4 ± 12.5	
PASP	31.7 ± 14.4	
Pulmonary hypertension (PASP ≥ 40 mmHg)	5 (10)	
Autoantibodies		
ANA	39/50 (78.0)	
Anti-Scl-70	4/44 (9.1)	
RF	35/50 (75.0)	

Medications	
Prednisolone <20mg/day	6 (12)
Mycophenolate mofetil	4 (8)
Previous methotrexate administration	10 (20)
Previous rituximab administration	2 (4)
Previous cyclophosphamide administration	12 (24)

Data are shown as mean (\pm standard deviation), median (interquartile ranges) or number (n).

^a Mann-Whitney, $p=1.000$; ^b t-student, $p=0.448$.

Abbreviations: SSc: systemic sclerosis; ANA: anti-nuclear antibodies; Anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA; Anti-Scl70: antitopoisomerase I; RF: rheumatoid factor; DLCOc: diffusion capacity of carbon monoxide corrected for hemoglobin; FVC: forced vital capacity; PASP: pulmonary arterial systolic pressure on Doppler echocardiography.

Circulating monocyte subpopulations

Results of monocytes evaluation are shown in Figure 2. SSc patients had higher absolute and relative number of circulating monocytes when compared to HC (459.6 (322.9-550.3)/mm³ vs. 273.9 (179.3-352.2)/mm³, $p<0.001$), this difference remained significant when comparing lSSc or dSSc patients with HC independently. Among monocyte subpopulations, SSc patients had higher absolute counts of all subpopulations (classical, intermediate and non-classical) when compared to HC (classical monocytes 346.2 (260.9-450.8)/mm³ vs. 209.8 (146.1-287.1)/mm³, $p<0.001$; intermediate monocytes 38.2 (24.6-47.1)/mm³ vs. 25.4 (12.6-41.2)/mm³, $p=0.005$; non-classical monocytes 41.2 (20.8-58.3)/mm³ vs. 28.3 (11.5-46.1)/mm³, $p=0.006$). Regarding disease subtype, lSSc patients presented increased absolute values of all monocyte subpopulations when compared to HC (classical monocytes 363.2 (262.9-451.8)/mm³ versus 209.8 (146.1-287.1)/mm³, $p<0.001$; intermediate monocytes 38.5 (24.7-47.5)/mm³ versus 25.4 (12.6-41.2)/mm³, $p=0.009$; non-classical monocytes 42.5 (20.8-69.0)/mm³ versus 28.3 (11.5-46.1)/mm³, $p=0.005$). While in dSSc patients, only classical monocytes had increased absolute counts compared to HC (209.8 (146.1-287.1)/mm³ vs 326.5 (231.2-461.9)/mm³, $p=0.003$). There was no difference in monocytes absolute or relative values between lSSc and dSSc subgroups.

Circulating CD16+ monocyte subpopulations

When analyzing intermediate and non-classical monocytes as a single group of CD16+ monocytes, we identified a higher absolute count of this subpopulation in SSc patients compared to HC (79.9 (53.4-103.5)/mm³ vs. 55.9 (26.8-85.8)/mm³, $p=0.003$) (Fig.2 E).

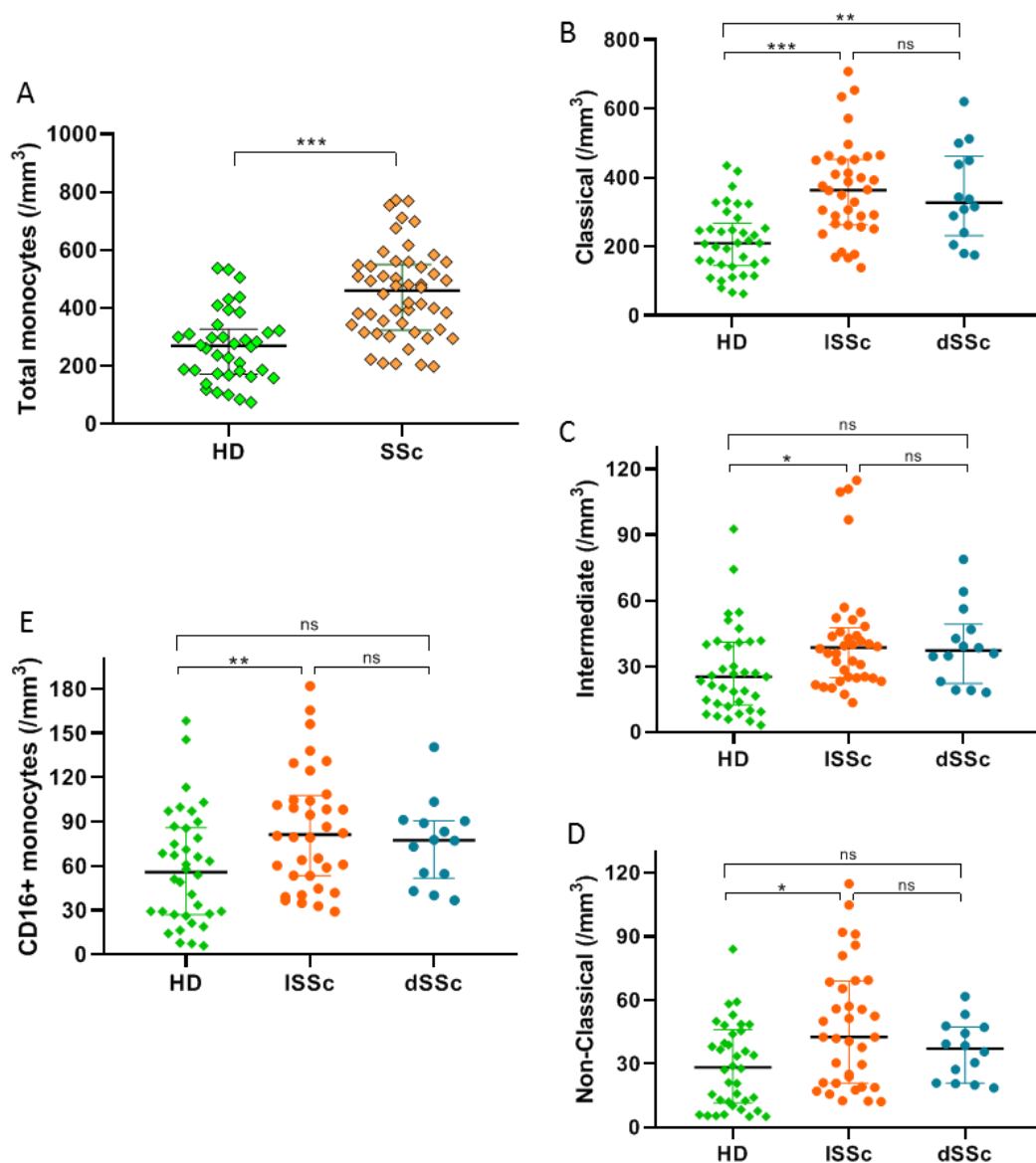


Figure 2. Monocyte subpopulations according to the membrane expression of CD14 and CD16 in systemic sclerosis (SSc) patients, healthy controls (HC), in SSc patients limited (ISSc) and diffuse (dSSc). Monocytes absolute value (mm^3) is increased in (SSc) patients compared to HC (A). The absolute count of all monocyte subpopulations - classical (B), intermediate (C) and non-classical (D) - is increased in SSc compared to HC. When analyzing intermediate and non-classical monocytes as a single group of CD16+ monocytes, their absolute value is increased in SSc compared to HC (E). Kruskal-Wallis test adjusted by Dunn's test for multiple comparisons. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Monocyte subpopulations and clinical manifestations

Absolute counts of monocyte subpopulations, did not correlate with severity of cutaneous fibrosis assessed by the modified Rodnan skin score, pulmonary involvement assessed by DLCOc/VA, FVC and pulmonary artery systolic pressure, or disease duration when evaluated

among the total of patients or in ISSc and dSSc subtypes (Figure 3) (Supplemental tables 1 and 2).

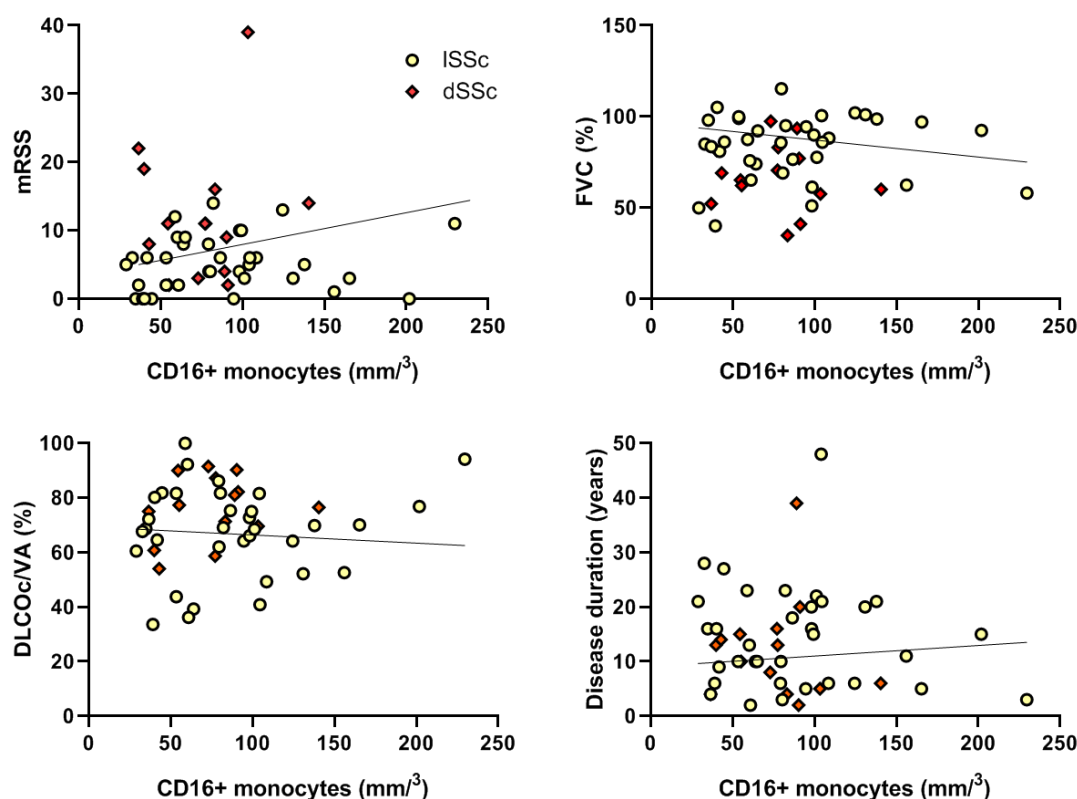


Figure 3. Correlation about CD16+ monocyte subpopulation. The CD16+ monocyte subpopulation to SSc patients (n = 50) and in the sub-group of patients presenting a ISSc (n = 36) and dSSc (n = 14) was tested for association with cutaneous fibrosis assessed by the modified Rodnan skin score (mRSS) (A), pulmonary involvement assessed by DLCOc/VA (B) and FVC (C). The time of disease that was not associated with the CD16 + values was also evaluated (E). R = Spearman correlation coefficient test. DLCO diffusion capacity for carbon monoxide; FVC forced vital capacity.

Expression of surface receptors in monocyte subpopulations

Results of surface expression of HLA-DR, CD206, CD169 and CD163 receptors are shown in figure 4 (Supplemental 3). There were different expression patterns among the evaluated monocyte subpopulations. HLA-DR, an activation marker, was consistently expressed in all monocytes from SSc and HC. HLA-DR intensity of expression was higher in all monocyte subsets from ISSc and dSSc patients when compared to control. CD206 expression varied among the monocyte subsets, the percentage of expression was higher in classical and intermediate monocytes of SSc patients when compared to HC and its MFI expression was lower in SSc as compared to HC. When analyzing SSc subgroups, percentage of CD206, the mannose receptor-1, expression was higher only in classical monocytes of ISSc patients

compared to HC and in intermediate monocytes of ISSc and dSSc compared to HC; whereas MFI of CD206 expression was lower in both ISSc and dSSc classical monocytes when compared to HC (data not shown). CD163, macrophage scavenger receptor, was more expressed in classical (percentage and MFI) and intermediate (percentage) monocytes of SSc patients as compared to HC. In subgroup analysis, a difference in CD163 expression was demonstrated in classical monocytes of ISSc subjects compared to the control group. CD169 receptor had a higher percentage of expression in SSc versus HC. When evaluating SSc subtypes, classical and intermediate monocytes from dSSc patients had higher MFI (data not shown) and percentage of CD169 expression than ISSc and HC, whereas non-classical monocytes of dSSc patients had higher percentage of this marker expression.

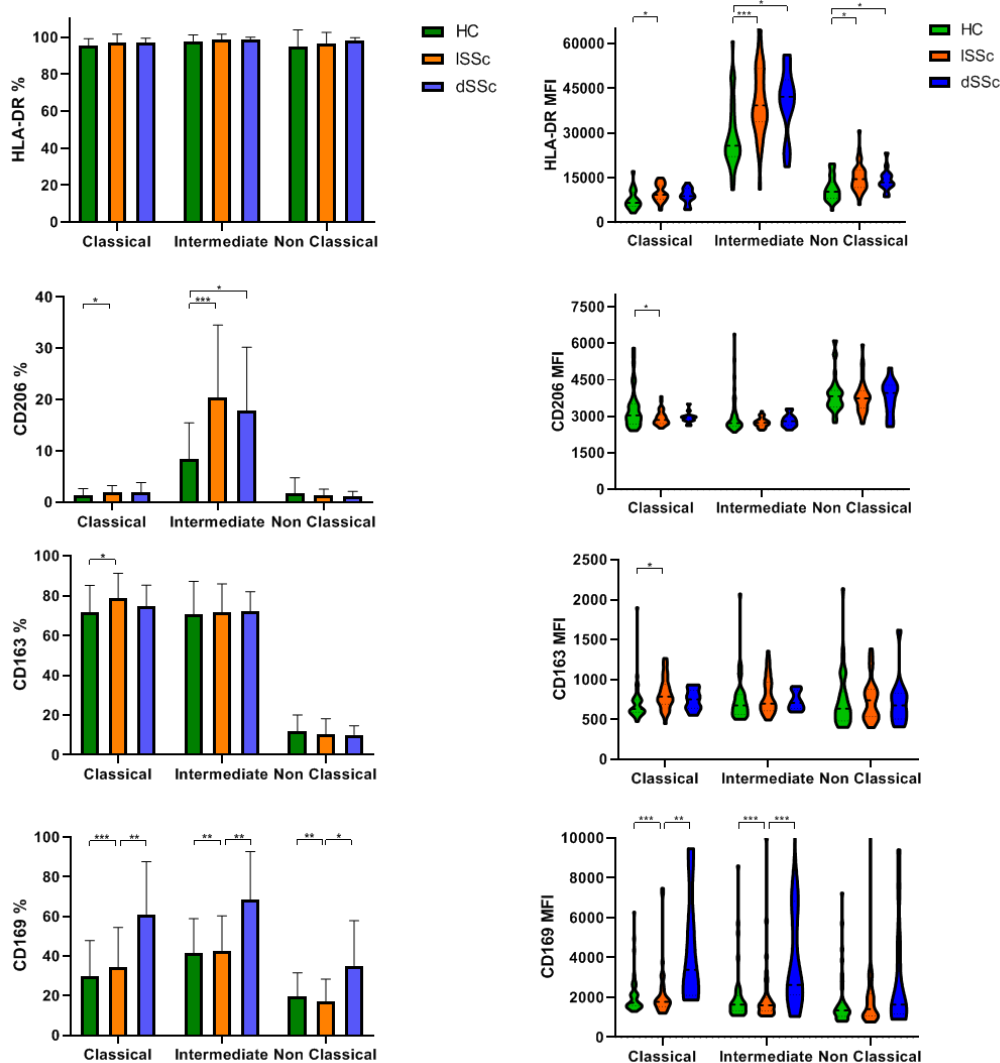


Figure 4. Expression of percentual and Mean fluorescence intensity in monocyte subpopulations. Surface receptors under study on monocyte subpopulations of systemic sclerosis patients divided by disease subtype in ISSc and dSSc compared with healthy controls (HC). ANOVA with Tukey correction for symmetric distribution and Kruskal-Wallis with Dunn correction for asymmetric distribution. MFI: mean fluorescence intensity. SSc: systemic sclerosis; HC: healthy controls;

ISSc: systemic sclerosis limited; dSSc: systemic sclerosis diffuse. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Further analyses (supplemental table 3) were performed for comparison of the markers MFI of expression among the different monocyte subpopulations. Except for CD163 expression, the monocyte subpopulations exhibited distinct expression patterns when compared to one another, which was similar among patients subgroups.

DISCUSSION

In our study, monocytes percentage and absolute count were significantly increased in SSc patients as compared to healthy subjects, regardless of disease subtype. Monocytosis in SSc patients has been reported in previous studies. (5, 22) Assessment of CD14 and CD16 receptors expression allowed the identification of all three monocyte subpopulations, as already described for healthy individuals and some disease states. (11, 23-25) However, our study describes these subpopulations in SSc patients, using specific markers CD14 and CD16 for such distinction according to positivity and MFI of expression.

We identified an increase in all monocyte subpopulations in SSc patients when compared to HC, and this increase was even more significant in patients with lSSc. Interestingly, lSSc patients showed an increase of all three monocyte subpopulations relative to controls, whereas in dSSc patients that increase was at expense of classical monocytes, indicating that in this form of disease the CD16⁺ monocyte subpopulations does not increase. Recent studies in SSc patients have shown an increase in CD16⁺ monocytes in the peripheral blood of these patients, however, these studies did not distinguish between intermediate and non-classical subpopulations. (5, 22)

Previous studies have shown a significant correlation of the absolute CD16⁺ monocyte subpopulation count and severity of skin fibrosis and pulmonary fibrosis. (5, 26) In our study, we found a significant increase in absolute values of the three monocyte subpopulations (classical, intermediate, non-classical) in SSc patients compared to controls. However, we did not find correlations between monocyte subpopulations and the clinical manifestations evaluated. This difference may be related with intermediate and non-classical monocyte subpopulations grouped into CD16⁺ monocyte. There is a strong proximity between those two monocyte subpopulations, (11) suggesting a direct developmental relationship between them, where gain of CD16 expression and decrease in CD14 expression may be indicative of maturation (27) and inflammatory activation for these cells to be recruited to the periphery, where they begin to act in localized inflammatory processes. (5)

In addition, there are resident tissue macrophages originated from the yolk sac or from fetal liver progenitors (28), that have long tissue life and self-renewing ability by *in situ* proliferation, even in the absence of recruitment from circulating monocytes. (29-31) The role of these macrophages in tissues during inflammation is still unclear and further research is needed on the role of circulating monocytes for their activation and proliferation, especially in inflammation models.

A similar subdivision of monocyte subpopulations is observed in mice, based on high expression of Ly6C in classical monocytes (Ly6C+) and its absence in non-classical monocytes (Ly6C-). (32) Previous studies suggest that, in mice, non-classical monocytes (Ly6C-, CD16+ in humans) originate M2 macrophages in inflammatory processes and tissue injury, (8, 33) inducing repair and activation of fibroblasts. (34, 35) Also, in inflammation models, there is an increase in the number of circulating classical monocytes (Ly6C+) and these cells are recruited to inflammation sites. (36) However, this relationship of circulating monocytes activation and infiltration of these cells into tissues is not well understood. Caution and more consistent information are required for data on animal models to be extrapolated into humans, since there are phenotypic and functional differences between macrophages and monocytes among species. (37) Furthermore, no experimental model of SSc has ever been able to represent the full spectrum of the complex pathophysiology seen in the human disease. The CD16+ monocyte subset appears to be a source for M2 macrophages, cells that tend to have less phagocytic activity, superior cytokine production capacity, and higher antigen presentation ability, related to increased HLA-DR expression. (38) HLA-DR is a cell activation marker, so it is consistent to find a greater expression intensity of this marker in patients with autoimmune diseases when compared to normal subjects. We found an increase in HLA-DR MFI expression in all monocyte subpopulations of SSc patients compared to HC. MFI of HLA-DR expression in CD16+ monocyte subpopulations (intermediate and non-classical) was significantly higher than that of CD16- classical monocytes, indicating a greater activation of CD16+ antigen-presenting cells, which is expected in an autoimmune state.

Other molecules, such as capture receptor CD163 and CD206 were also associated with M2 macrophages and could be involved into further differentiation processes. A previous study comparing the expression of monocyte and macrophage markers in peripheral blood and skin biopsy specimens showed higher percentages of circulating cells expressing CD204, CD163 and CD14, furthermore these findings were correlated with skin involvement. (22) Additionally, circulating CD14+ monocytes/macrophages with CD206 coexpression have been shown to be associated with pulmonary artery hypertension. (14) It has also been shown

that macrophages derived from circulating monocytes have coexpression of CD206, CD163 and CD169, and that the expression of these markers is significantly higher in patients with pulmonary interstitial disease. (3) In our study, a higher percentage of classical and intermediate monocytes with CD206 expression was identified in SSc patients compared to HC, which demonstrates a greater amount of M2-like cells in this subgroup. Using a flow cytometry approach for assessing surface markers from circulating monocytes/macrophages, Soldano *et al.* (2018) demonstrated that SSc patients have higher expression of the M2 related markers CD14, CD206, CD163 and CD204; or that there is a coexpression of M1 and M2 surface markers in those cells; (39) providing evidence of plasticity in the markers expression of circulating monocyte/macrophage and that monocytes can evolve to exhibit features that are shared by more than one macrophage population.

Most studies concluded that SSc macrophages have an M2 activation profile based on the expression of CD163 and/or CD206. This evaluation format has limited *in vivo* application since macrophage activation is induced by exposure to cytokines secreted locally. (1) To support this fact, a study carried out a genomic approach using a consensus cluster to compare biopsies of different tissues, including mononuclear cells of the skin, lung and peripheral blood, and the authors described the concept of the immuno-fibrotic axis, (1) reinforcing the fundamental role of macrophages in the pathogenesis of SSc.

Previous studies have suggested that CD169 (Siglec-1) may be a phagocyte activity marker in inflammatory disorders. CD169 is a marker for highly pathogenic phagocytes in multiple sclerosis and increased expression of Siglec-1 on peripheral blood monocytes and its role in mononuclear cell reactivity to autoantigen has been shown in rheumatoid arthritis. (40, 41). CD169 expression in renal macrophages has been correlated with proteinuria and tissue damage in glomerulonephritis, however the marker expression in peripheral blood cells was not assessed. (42) CD169 expression has also been associated with involvement in the immune system regulation. (43) Biological functions of CD169 in macrophages and monocytes have yet to be elucidated. In our study, there was an increased expression of CD169 in classical monocytes from SSc patients compared to controls, and CD169 expression was higher in all monocyte subpopulations of dSSc patients compared to lSSc and controls, in contrast to that reported by York *et al.* (2007). (16) This finding could represent a greater disease activity in this subgroup of patients.

Our data corroborate the results obtained by Lescoat *et al.* (2017) and Trombetta *et al.* (2018) concerning the increased amount of circulating monocytes with CD16+ monocytes as the main representative of SSc patients. (5, 44) Nevertheless, it differs regarding the correlations

with clinical manifestations. The fact that we did not find a correlation of monocyte subsets with clinical manifestations reinforces the hypothesis of cellular modulation and activation *in loco*, since the different tissues are able to direct the inflammatory response in order to exacerbate inflammation with pro-inflammatory mediators or into resolution and repair. (45) Hence, findings of monocyte/macrophage activation in the bloodstream may not be observed at the tissue level, specifically, in internal organs affected by SSc.

As to the use of medications, no association of these with subpopulations of monocytes was found. There were no differences between patients monocyte subpopulations regarding corticosteroids use (n=6). Patients included in the study used low doses (less than 20 mg per day), similar finding to literature. (5)

Our study has some limitations. First of all, the patient population appears to be relatively small. However, there were many restrictions for patient inclusion in order to minimize treatment interference and disease overlap. Evaluation of exclusively circulating cells is also a limitation. There is a need for simultaneous assessment of circulating cells and tissue biopsies to better understand the participation of macrophages derived from circulating monocytes in tissue fibrosis.

As reported by Stifano and Christmann (2016) in the review "Macrophage involvement in systemic sclerosis: do we need more evidence?", (46) we have evidence that monocytes and macrophages actually participate in SSc pathogenesis and that there are slight differences between tissues. (1) Nevertheless, we need better strategies to analyze these cells and studies assessing different tissues and peripheral blood to determine whether these macrophages are derived from circulating monocytes or other cells.

CONCLUSION

In conclusion, our results showed that SSc patients have increased absolute counts of all three monocyte subpopulations and that there is no difference among monocyte subpopulations between lSSc and dSSc disease subtypes. Monocytes from SSc patients presented a more activated phenotypic profile which was suggestive of M2 cells, with higher expression of CD206. Opposing to previous reports, we did not find an association between monocyte subpopulations and major fibrotic manifestations.

The intermediate and non-classical monocyte subpopulations of SSc patients have increase expression of HLA-DR, reflecting the activation state of these cells. CD169 appears to be more representative marker for dSSc subtype, however, more studies are necessary to confirm that this is a good marker for differentiation of disease subtype.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the FIPE/HCPA and CNPq for the financial support.

Supplemental table 1. Spearman correlation coefficient values.

Groups	Monocyte Subpopulation	DLCOc/V A	CVF	PSAP	Rodna n	Disease duration
SSc	Classical	-0,153	-0,115	0,198	0,101	-0,152
	Intermediate	0,144	-0,058	0,121	0,127	-0,038
	Non-Classicals	-0,037	0,217	-0,063	0,093	-0,034
	CD16+	0,025	0,115	0,022	0,085	-0,037
ISSc	Classical	-0,086	-0,134	0,089	0,113	-0,084
	Intermediate	0,147	-0,029	0,191	0,278	-0,025
	Non-Classicals	-0,008	0,199	-0,252	0,149	-0,085
	CD16+	0,048	0,145	-0,092	0,189	-0,077
dSSc	Classical	-0,196	-0,253	0,178	0,141	-0,339
	Intermediate	0,238	-0,266	0,105	-0,053	-0,035
	Non-Classicals	-0,056	0,174	0,237	0,104	-0,170
	CD16+	0,119	-0,187	0,150	-0,057	-0,086

SSc: systemic sclerosis; HC: healthy controls; ISSc: systemic sclerosis limited; dSSc: systemic sclerosis diffuse. $p > 0.05$ for all correlations.

Supplemental table 2. Analysis of the absolute counts of CD16+ monocytes in relation to the time of disease separated by tercil.

Monocytes CD16+ subpopulations (/mm ³)	<9 years	9 - 16 years	>16 years	p* global
SSc	86,8 (63,9-120,5)	62,1 (2,6-84,2)	90,1 (54,7-104,4)	0,197
dSSc	86,8 (63,9-112,6)	54,9 (42,2-77,3)	90,1 (89,1-91,2)	0,100
ISSc	87,5 (55,4-134,7)	64,5 (44,6-99,1)	92,3 (51,2-111,2)	0,680

*Spearman correlation test. SSc: systemic sclerosis; HC: healthy controls; ISSc: systemic sclerosis limited; dSSc: systemic sclerosis diffuse. $p > 0.05$ for all correlations.

Supplemental table 3. Comparison of the MFI markers among the monocyte subpopulations.

Groups	Receptors	Classical Monocytes	Intermediate Monocytes	Non-Classical Monocytes	p
SSc	HLA-DR (MFI)	9,665 ± 2,831 ^a	42,260 ± 13,630 ^c	14,819 ± 4,523 ^b	<0.001
	CD206 (MFI)	2,940 ± 277.6 ^b	2,772 ± 208.3 ^a	3,799 ± 675 ^c	<0.001
	CD169 (MFI)	1,961 (1,670-3,154) ^b	1,862 (1,370-2,758) ^{ab}	1,527 (1,075-2,377) ^a	<0.001
	CD163 (MFI)	803.5 ± 185.4	780.6 ± 202.4	743.1 ± 269.6	0.250
HC	HLA-DR (MFI)	7,651 ± 3,348 ^a	29,035 ± 10,972 ^c	11,311 ± 4,039 ^b	<0.001
	CD206 (MFI)	3,329 ± 835.3 ^a	3,162 ± 1,266 ^a	3,926 ± 791 ^b	0.004
	CD169 (MFI)	1,731 (1,570-2,265) ^b	1,635 (1,318-2,080) ^a	1,338 (1,045-1,719) ^a	<0.001
	CD163 (MFI)	706.1 ± 235.2	745.0 ± 282.3	737.4 ± 345.1	0.104
ISSc	HLA-DR (MFI)	9,935 ± 2,891 ^a	43,014 ± 14,484 ^c	15,020 ± 4,823 ^b	<0.001
	CD206 (MFI)	2,936 ± 299.3 ^b	2,751 ± 186.4 ^a	3,804 ± 672.3 ^c	<0.001
	CD169 (MFI)	1,777 (1,533-2,287) ^b	1,606 (1,320-1,987) ^a	1,413 (1,071-2,180) ^a	0.001
	CD163 (MFI)	825.2 ± 201.1	798.2 ± 226.6	749 ± 258.9	0.307
dSSc	HLA-DR (MFI)	8,971 ± 2,643 ^a	40,322 ± 11,393 ^c	14,301 ± 3,751 ^b	<0.001
	CD206 (MFI)	2,951 ± 221 ^a	2,826 ± 256.6 ^a	3,787 ± 707.2 ^b	0.001
	CD169 (MFI)	3,379 (2,105-6,501) ^b	2,684 (2,217-6,816) ^b	1,635 (1,166-4,271) ^a	0.004
	CD163 (MFI)	747 ± 126.7	735.1 ± 114.6	727.3 ± 304.9	0.798

SSc: systemic sclerosis; HC: healthy controls; ISSc: systemic sclerosis limited; dSSc: systemic sclerosis diffuse.

Superscript letters in the same line represent statistically significant differences (p<0.05).

^{a,b,c} Letras iguais não diferem pelo teste de Bonferroni (paramétrico) ou Dunn (não-paramétrico) a 5% de significância

REFERENCES

1. Taroni JN, Greene CS, Martyanov V, Wood TA, Christmann RB, Farber HW, et al. A novel multi-network approach reveals tissue-specific cellular modulators of fibrosis in systemic sclerosis. *Genome Med.* 2017;9(1):27.
2. Bossini-Castillo L, Simeon CP, Beretta L, Vonk MC, Callejas-Rubio JL, Espinosa G, et al. Confirmation of association of the macrophage migration inhibitory factor gene with systemic sclerosis in a large European population. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50(11):1976-81.
3. Lescoat A, Ballerie A, Augagneur Y, Morzadec C, Vernhet L, Fardel O, et al. Distinct Properties of Human M-CSF and GM-CSF Monocyte-Derived Macrophages to Simulate Pathological Lung Conditions In Vitro: Application to Systemic and Inflammatory Disorders with Pulmonary Involvement. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
4. Becker H, Willeke P, Schotte H, Domschke W, Gaubitz M. Macrophage migration inhibitory factor may contribute to vasculopathy in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2008;27(10):1307-11.
5. Lescoat A, Lecureur V, Roussel M, Sunnaram BL, Ballerie A, Coiffier G, et al. CD16-positive circulating monocytes and fibrotic manifestations of systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2017;36(7):1649-54.
6. Ziegler-Heitbrock HW, Ströbel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, et al. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood.* 1992;79(2):503-11.
7. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010;33(3):375-86.
8. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:669-92.
9. Almeida J, Bueno C, Algueró MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, et al. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin Immunol.* 2001;100(3):325-38.
10. van Furth R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr Top Pathol.* 1989;79:125-50.
11. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):41-57.
12. Passlick B, Fliieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527-34.
13. González-Domínguez É, Domínguez-Soto Á, Nieto C, Flores-Sevilla JL, Pacheco-Blanco M, Campos-Peña V, et al. Atypical Activin A and IL-10 Production Impairs Human CD16+ Monocyte Differentiation into Anti-Inflammatory Macrophages. *J Immunol.* 2016;196(3):1327-37.
14. Christmann RB, Hayes E, Pendergrass S, Padilla C, Farina G, Affandi AJ, et al. Interferon and alternative activation of monocyte/macrophages in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum.* 2011;63(6):1718-28.
15. Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood.* 2014;123(20):e110-22.
16. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum.* 2007;56(3):1010-20.
17. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2737-47.
18. Johnson SR, Feldman BM, Hawker GA. Classification criteria for systemic sclerosis subsets. *J Rheumatol.* 2007;34(9):1855-63.
19. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001;28(7):1573-6.

20. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1995;22(7):1281-5.
21. Roederer M. Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2002;Chapter 1:Unit 1.14.
22. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, et al. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):R128.
23. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* 2012;64(3):671-7.
24. Cavaliere FM, Prezzo A, Bilotta C, Iacobini M, Quinti I. The lack of BTK does not impair monocytes and polymorphonuclear cells functions in X-linked agammaglobulinemia under treatment with intravenous immunoglobulin replacement. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175961.
25. Burbano C, Vasquez G, Rojas M. Modulatory effects of CD14+CD16++ monocytes on CD14++CD16- monocytes: a possible explanation of monocyte alterations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(12):3371-81.
26. Mahoney JM, Taroni J, Martyanov V, Wood TA, Greene CS, Pioli PA, et al. Systems level analysis of systemic sclerosis shows a network of immune and profibrotic pathways connected with genetic polymorphisms. *PLoS Comput Biol.* 2015;11(1):e1004005.
27. Lambert C, Preijers FWMB, Yanikkaya Demirel G, Sack U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017;92(3):180-8.
28. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity.* 2013;38(1):79-91.
29. Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao CT, Scurr MJ, Brombacher F, et al. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun.* 2013;4:1886.
30. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* 2013;38(4):792-804.
31. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science.* 2011;332(6035):1284-8.
32. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-80.
33. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007;317(5838):666-70.
34. Baker JV, Hullsiek KH, Singh A, Wilson E, Henry K, Lichtenstein K, et al. Immunologic predictors of coronary artery calcium progression in a contemporary HIV cohort. *AIDS.* 2014;28(6):831-40.
35. Hamers AA, Vos M, Rassam F, Marinković G, Marincovic G, Kurakula K, et al. Bone marrow-specific deficiency of nuclear receptor Nur77 enhances atherosclerosis. *Circ Res.* 2012;110(3):428-38.
36. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19(1):71-82.
37. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723-37.
38. Abeles RD, McPhail MJ, Sowter D, Antoniadou CG, Vergis N, Vijay GK, et al. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure. *Cytometry A.* 2012;81(10):823-34.

39. Soldano S, Trombetta AC, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Brizzolara R, et al. Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2018.
40. Bogie JF, Boelen E, Louagie E, Delputte P, Elewaut D, van Horssen J, et al. CD169 is a marker for highly pathogenic phagocytes in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018;24(3):290-300.
41. Xiong YS, Cheng Y, Lin QS, Wu AL, Yu J, Li C, et al. Increased expression of Siglec-1 on peripheral blood monocytes and its role in mononuclear cell reactivity to autoantigen in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(2):250-9.
42. Ikezumi Y, Suzuki T, Hayafuji S, Okubo S, Nikolic-Paterson DJ, Kawachi H, et al. The sialoadhesin (CD169) expressing a macrophage subset in human proliferative glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(12):2704-13.
43. Oetke C, Vinson MC, Jones C, Crocker PR. Sialoadhesin-deficient mice exhibit subtle changes in B- and T-cell populations and reduced immunoglobulin M levels. *Mol Cell Biol*. 2006;26(4):1549-57.
44. Trombetta AC, Soldano S, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Paolino S, et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir Res*. 2018;19(1):186.
45. Matzinger P, Kamala T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(3):221-30.
46. Stifano G, Christmann RB. Macrophage Involvement in Systemic Sclerosis: Do We Need More Evidence? *Curr Rheumatol Rep*. 2016;18(1):2.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram que os pacientes com ES apresentam um aumento significativo de monócitos. Sendo que todas as subpopulações de monócitos estudadas apresentaram quantificações maiores nos pacientes, mas, entre os subtipos da doença, limitada e difusa, não apresentaram diferença.

Os monócitos de pacientes com ES apresentaram perfil fenotípico mais ativado e sugestivo de células M2, com maior expressão de CD206. O desequilíbrio nas características fenotípicas dos monócitos e a ativação de macrófagos têm sido considerados essenciais para o desenvolvimento de desordens inflamatórias, caracterizadas principalmente pelo envolvimento cutâneo e pulmonar. CD169 se demonstrou mais representativo na ES difusa, sendo um marcador promissor para diferenciar os subtipos da doença.

Apesar dos pacientes apresentarem maior quantidade de monócitos, não houve associação entre as subpopulações de monócitos e as variáveis clínicas avaliadas. O fato de não termos encontrado correlação com manifestações clínicas reforça a hipótese da modulação e ativação celular *in loco*, uma vez que os diferentes tecidos são capazes de direcionar a resposta inflamatória de forma a exacerbar inflamação com mediadores pró-inflamatórios ou então direcionar para resolução e reparo. Assim, achados de ativação de monócitos/macrófagos na corrente sanguínea, podem não ser observados no nível tecidual, ou seja, em órgãos internos afetados pela ES.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

De fato, há um forte interesse atual em elucidar a contribuição das células imunes inatas aos processos patogênicos. Para isso, se faz necessária a clarificação das relações entre o fenótipo das células circulantes e das células observadas nos tecidos periféricos. Diante disso, o próximo passo será estudar marcadores celulares de subpopulações de monócitos do sangue periférico em comparação com achados de tecidos (principalmente pele e pulmão).

Não há consenso sobre a questão dos monócitos circulantes pró-fibróticos apresentarem ativação mista M1/M2. O grupo pretende reavaliar as aquisições de citometria modificando a estratégia de análise tendo em vista publicações mais recentes que forneceram achados para a possível existência de um fenótipo de ativação mista M1/M2 (Lescoat et al., e Trombetta et al., 2018). Há possibilidade de uma estratégia de análise partindo da expressão de CD206, por ser um marcador mais conhecido em monócitos/macrófagos. Dessa forma, a diferenciação de subpopulações não mais partirá da expressão de CD14 e CD16.

O CD169 parece ser um marcador de forma cutâneo-difusa. Estudos com coorte maior de pacientes se fazem necessários para afirmarmos se este marcador poderia ser usado para diferenciação de subtipo da doença.

É necessário estudos com avaliação mais minuciosa das propriedades de ativação de macrófagos derivados de monócitos circulantes, distinção quanto a marcadores de funções pró-inflamatórias, pró-fibróticas e em uma possível distinção aos macrófagos teciduais residentes. Essa abordagem funcional mais ampla poderá auxiliar na identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da ES e de outras doenças inflamatórias ou fibróticas.

Concomitante a este estudo dos monócitos, foram desenvolvidos outros projetos de pesquisa avaliando citocinas do perfil Th1 e Th2, distinção de percentuais e absolutos das subpopulações de linfócitos T, B e células NK, no mesmo grupo de paciente. (Anexo 10.6) Com os resultados destes estudos pretendemos contribuir para o direcionamento de novos projetos de pesquisa.

10. ANEXOS

10.1 CARTA DE APROVAÇÃO



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 140697

Data da Versão do Projeto: 27/10/2015

Pesquisadores:

RICARDO MACHADO XAVIER

RAFAEL MENDONÇA DA SILVA CHAKR

ANA PAULA ALEGRETTI

Título: Estudo de marcadores de monócitos/macrófagos em pacientes com Esclerose Sistêmica.

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 12 de novembro de 2015.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

10.2 QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO SISTÊMICA

AVALIAÇÃO SISTÊMICA

Data: ____/____/____ Hora da coleta: _____ Prontuário: _____

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone: _____/_____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Gênero: () Masculino () Feminino

Estado civil: () Solteiro () Casado () Viúvo

Raça (auto-atribuição): () Negra () Branca () Pardo Outra: _____

Profissão: _____

Costuma expor-se ao sol: () Nunca () <20min () >20min

Com qual frequência: () Nunca () Diária () 2-3x na semana () 1x na semana

Usa protetor solar? () Nunca () Sempre () As vezes

Hipertensão Arterial Sistêmica () Não () Sim

Crise renal esclerodérmica prévia () Não () Sim

Diabetes: () Não () Sim

Fuma: () Nunca () Sim atual () Sim prévio () Passivo

Por quanto tempo: _____ Cigarros/dia: _____ Se parou, quando: _____

Perda de peso recente () Não () Sim quantos kg/tempo: _____

Tem alguém na família com esclerose sistêmica, lúpus, artrite reumatoide, espondiloartrite?

Se sim, quem e qual doença? _____

Faz uso de algum tipo de vitamina () Não () Sim Qual: _____

Subtipo da doença (atual)

() 1- Difusa () 2- Limitada () 3- Sem Esclerodermia

Início do fenômeno de Raynaud (FRy): _____ (mês/ano)

Início do primeiro sintoma excluindo-se o FRy: _____ (qual/mês/ano)

Data do diagnóstico de Esclerose Sistêmica: _____ (mês/ano)

Pesquisa de envolvimento Cutâneo/Sistêmico (último mês):

() Tosse () Dor torácica () Pirose () Disfagia () Diarreia/constipação

Dispneia - NYHA: _____

1 = Assintomático, sem limitações.

2 = Dispneia leve, mas limitações em atividades rotineiras.

3 = Limitação para atividades menores que as habituais, confortáveis apenas em repouso.

4 = Grave limitação, dispneia mesmo em repouso.

TABELA 3
ÍNDICE DE ATIVIDADE DO ESCSG

Item	Score
Escore de Rodnan modificado (mRSS > 14)	1,0
Esclerodema	0,5
Delta-pele*	2,0
Necrose digital	0,5
Delta-vascular*	0,5
Artrite	0,5
DLC0 < 80%	0,5
Delta-rosação-pulmão*	2,0
VHS > 30 mm na primeira hora	1,5
Hipocomplementenemia	1,0
Índice total de atividade de doença	10,0

ESCSG = European Scleroderma Study Group; DLC0 = Difusão de Monóxido de Carbono;
VHS = Velocidade de Hemossedimentação.

* Picra orgânica relevante referida pelo paciente em relação ao mês anterior.

** Para definição das variáveis veja a referência 26.

Perguntar => Suas manifestações de pele pioraram no último mês?

Inclui úlceras digitais ativas até gangrena digital

Perguntar => Suas manifestações de fluxo sanguíneo [extremidades] mudaram no último mês?

Perguntar => Suas manifestações de coração e pulmão mudaram no último mês?

Atividade => Índice maior que 3

PA (sentado): _____ / _____ mmHg Peso: _____ kg Altura: _____ cm

Auscultas pulmonar: () Normal () Crepitações – Se crepitações, especificar:

() 1/3 superior direito () 1/3 superior esquerdo

() 1/3 médio direito () 1/3 médio esquerdo

() 1/3 inferior direito () 1/3 inferior esquerdo

ESCORE CUTÂNEO

Rodnan modificado por Clements: 0= normal 1- espessamento leve 2- moderado 3-severo

	DIREITA	ESQUERDA	
Quirodáctilos	0 1 2 3	0 1 2 3	
Mãos	0 1 2 3	0 1 2 3	
Antebraços	0 1 2 3	0 1 2 3	
Braços	0 1 2 3	0 1 2 3	
Face	0 1 2 3		
Tórax anterior	0 1 2 3		
Abdome	0 1 2 3		
Coxas	0 1 2 3	0 1 2 3	
Pernas	0 1 2 3	0 1 2 3	
Dorso dos pés	0 1 2 3	0 1 2 3	Total: _____

() Úlceras Digitais () Úlceras (que não em dedos) () Reabsorção de polpas digitais

() Amputações () Calcinose () Pitting scars () FRy

Critérios de classificação ACR/EULAR 2013	
Espessamento cutâneo proximal às metacarpofalangeanas (critério suficiente)	9
Espessamento cutâneo dos dedos (apenas o maior escore):	
<i>Puffy fingers</i>	2
Esclerodactilia (distal às MCF e proximal às IFP – sobre a falange proximal)	4

Lesões nas pontas dos dedos (apenas o maior escore):	
Úlceras digitais	2
<i>Pitting scar</i>	3
Telangiectasia	2
Capilaroscopia anormal	2
Hipertensão arterial pulmonar OU doença intersticial pulmonar	2
Fenômeno de Raynaud	3
Autoanticorpos associados à ES:	
Anti-centrômero OU anti-topoisomerase I (anti-Scl 70) OU anti-RNA polimerase III	3
PONTUAÇÃO TOTAL	

Pacientes com pontuação ≥ 9 são classificadas como apresentando Esclerose Sistêmica definitiva.

Critérios do ACR 1980	
Critério maior	Esclerodermia proximal às articulações metacarpofalangeanas ou metatarsofalangeanas
Critério menor	Esclerodactilia Úlceras ou reabsorção de polpas digitais Radiografia com fibrose em bases pulmonares.

Presença do critério maior ou de, no mínimo, 2 dos critérios menores.

Critérios de LeRoy e Medsger 2001	
Evidência objetiva de Raynaud	+ Capilaroscopia com padrão SD OU autoanticorpos específicos (anti-centrômero, anti-Scl 70, anti-RNA polimerase III)
Relato subjetivo de Raynaud	+ Capilaroscopia com padrão SD E autoanticorpos específicos (anti-centrômero, anti-Scl 70, anti-RNA polimerase III)

OBSERVAÇÕES GERAIS:

Nome do avaliador.

10.3 TERMO DE CONSENTIMENTO - PACIENTES

Termo de Consentimento Informado

Projeto de Pesquisa: Associação entre os níveis de vitamina D e níveis séricos de citocinas Th1 (IL-12, INF- γ), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10), Th17 (IL-17, IL-23), em pacientes com Esclerose Sistêmica.

Estamos convidando o Sr (a) a participar de um projeto de pesquisa cujo alvo de estudo são biomarcadores em pacientes com Esclerose Sistêmica. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador para esclarecê-los.

Objetivo do estudo:

O nosso objetivo é estudar se existe associação entre os níveis de vitamina D e as citocinas Th1 (IL-12, INF- γ), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10), e Th17 (IL-17, IL-23) no sangue periférico de pacientes com esclerose sistêmica. Pois, até o momento, sabe-se bastante sobre a participação dos linfócitos T (resposta imune adaptativa), mas ainda muito pouco sobre a expressão das citocinas Th1 (IL-12, INF- γ), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10), e Th17 (IL-17, IL-23) e os níveis de vitamina D. Recentemente a complexidade das subpopulações dessas células e seu papel em outras doenças autoimunes inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso sistêmico, vem sendo reconhecida. Dessa forma, se tem a necessidade de estudar de maneira mais aprofundada a expressão das citocinas na esclerose sistêmica e os níveis de vitamina D.

Vantagens em participar do estudo:

Não podemos assegurar que você se beneficie diretamente com o estudo. Entretanto, as informações obtidas neste estudo poderão contribuir para um maior conhecimento sobre a doença e possíveis formas de tratamento.

Procedimentos:

Se você aceitar a participação, estará autorizando que seja realizada uma coleta de sangue, além de autorizar o acesso aos dados clínicos registrados no seu prontuário. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados da pesquisa, e caso seja solicitado, serão fornecidas todas as informações que você quiser saber.

Riscos:

Os possíveis desconfortos são aqueles associados com o procedimento de coleta de sangue, como: dor, hematoma ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local da punção podem ocorrer.

Ressarcimento

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Participação voluntária/Desistência do estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. A não participação no estudo ou desistência após ingressar no estudo não implicará em nenhuma alteração no acompanhamento médico. Após assinar o termo de consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na Instituição.

Confidencialidade dos dados:

Os pesquisadores se comprometem em manter a confidencialidade dos dados de identificação pessoal dos participantes e os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você poderá contatar o pesquisador responsável pela pesquisa para esclarecimento de alguma dúvida. O pesquisador responsável é o Dr. Ricardo Machado Xavier, que pode ser encontrado no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre ou no telefone: (51) 3359-8340. Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), situado no segundo andar do HCPA, sala 2227 na Rua Ramiro Barcelos, 2350, Bairro Santa Cecília, ou através do telefone: (51) 3359-7640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Este documento será emitido em duas vias. Uma via ficará com o pesquisador e outra com o participante.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____

10.4 STROBE STATEMENT

	Item No	Recommendation	Page No
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	43
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	44
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	45
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	46
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	47
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	46
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	46
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	46-47
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	46
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	NA
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	NA
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	47-48
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	48-49
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	NA
		(c) Explain how missing data were addressed	NA
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	NA
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA
Results			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	49-50

		(b) Give reasons for non-participation at each stage	NA
		(c) Consider use of a flow diagram	NA
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	49
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	NA
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	50
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	NA
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	NA
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	NA
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	NA
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	54
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	57
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	55-57
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	55-56
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	58

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

N/A: not applicable.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

10.5 TERMOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DE ARTIGOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

("Scleroderma, Systemic"[Mesh] OR "Scleroderma, Systemic" OR "SSc" OR "Systemic Sclerosis" OR "Sclerosis, Systemic" OR "Systemic Scleroderma" OR "Scleroderma, Diffuse"[Mesh] OR "Scleroderma, Diffuse" OR "Scleroderma, Progressive" OR "Progressive Scleroderma" OR "Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis" OR "Sudden Onset Scleroderma" OR "Scleroderma, Sudden Onset" OR "Sclerodermas, Sudden Onset" OR "Sudden Onset Sclerodermas" OR "Diffuse Systemic Sclerosis" OR "Diffuse Systemic Scleroses" OR "Scleroses, Diffuse Systemic" OR "Sclerosis, Diffuse Systemic" OR "Systemic Scleroses, Diffuse" OR "Systemic Sclerosis, Diffuse" OR "Diffuse Scleroderma" OR "Sclerosis, Progressive Systemic" OR "Progressive Systemic Sclerosis" OR "Systemic Sclerosis, Progressive" OR "Scleroderma, Limited"[Mesh] OR "Scleroderma, Limited" OR "Limited Scleroderma" OR "Limited Systemic Scleroderma" OR "Limited Systemic Sclerodermas" OR "Scleroderma, Limited Systemic" OR "Sclerodermas, Limited Systemic" OR "Systemic Scleroderma, Limited" OR "Systemic Sclerodermas, Limited" OR "CREST Syndrome"[Mesh] OR "CREST Syndrome" OR "CREST Syndromes" OR "Syndrome, CREST" OR "Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia Syndrome" OR "CRST Syndrome" OR "CRST Syndromes" OR "Syndrome, CRST" OR "Calcinosis-Raynaud Phenomenon-Sclerodactyly-Telangiectasia" OR "Calcinosis Raynaud Phenomenon Sclerodactyly Telangiectasia" OR "Phenomenon-Sclerodactyly-Telangiectasia, Calcinosis-Raynaud")

AND

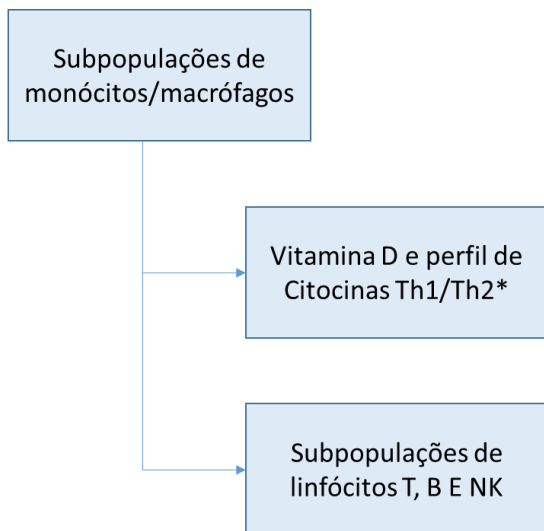
("Monocytes"[Mesh] OR "Monocyte" OR "Monocytes" OR "Macrophages"[Mesh] OR "Macrophage" OR "Macrophages" OR "Bone Marrow-Derived Macrophages" OR "Bone Marrow Derived Macrophages" OR "Bone Marrow-Derived Macrophage" OR "Macrophage, Bone Marrow-Derived" OR "Macrophages, Bone Marrow-Derived" OR "Monocyte-Derived Macrophages" OR "Monocyte Derived Macrophages" OR "Macrophage" OR "Macrophages, Monocyte-Derived" OR "Macrophage, Monocyte-Derived" OR "Macrophages, Monocyte Derived" OR "Monocyte-Derived Macrophage" OR "monocyte subpopulations" OR "Cell, Monocyte-Macrophage Precursor" OR "Cells, Monocyte-Macrophage Precursor" OR "Monocyte Macrophage Precursor Cells" OR "Monocyte-Macrophage Precursor Cell" OR "Precursor Cell, Monocyte-Macrophage" OR "Precursor Cells, Monocyte-Macrophage" OR "monocyte subset" OR "monocyte subpopulation" OR "monocyte classical" OR "CD14++CD16-" OR "monocyte intermediate" OR "CD14+CD16+" OR "monocyte nonclassical" OR "CD14+CD16++")

AND

("Flow Cytometry"[Mesh] OR "Flow Cytometry" OR "Microfluorometry, Flow" OR "Flow Microfluorometries" OR "Flow Microfluorometry" OR "Microfluorometries, Flow" OR "Flow Microfluorimetry" OR "Microfluorimetry, Flow" OR "Cytofluorometry, Flow" OR "Cytofluorometries, Flow" OR "Flow Cytofluorometries" OR "Flow Cytofluorometry" OR "Cytometry, Flow" OR "Cytometries, Flow" OR "Flow Cytometries" OR "Fluorescence-Activated Cell Sorting" OR "Cell Sorting, Fluorescence-Activated" OR "Cell Sortings, Fluorescence-Activated" OR "Fluorescence Activated Cell Sorting" OR "Fluorescence-Activated Cell Sortings" OR "Sorting, Fluorescence-Activated Cell" OR "Sortings, Fluorescence-Activated Cell")

10.6 FLUXOGRAMA DE ESTUDOS

Este trabalho de doutorado possui alguns estudos que foram realizados concomitantes a este, com análises realizadas no mesmo grupo de pacientes e controles.



* Artigos submetidos: -"Dualities of the vitamin D in systemic sclerosis: a systematic literature review"; Advances in Rheumatology.

-"Vitamin D and cytokine profiles in patients with systemic sclerosis"; Clinical Rheumatology.