

Lucas Pires Garcia Oliveira

**ANÁLISE *HIGH-THROUGHPUT* DE MONÓCITOS EM PACIENTES
COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

São Paulo

2024

Lucas Pires Garcia Oliveira

**ANÁLISE *HIGH-THROUGHPUT* DE MONÓCITOS EM PACIENTES
COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Inacio
Carvalho

São Paulo

2024

Oliveira, Lucas Pires Garcia

Análise *high-throughput* de monócitos em pacientes com doença inflamatória intestinal / Lucas Pires Garcia Oliveira. -- São Paulo, 2024.
xvi, 84 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *High-throughput analysis of monocytes from inflammatory bowel disease patients.*

1. Sistema digestório. 2. Células mieloides. 3. Doenças inflamatórias intestinais. 4. Doença de Crohn.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Lucas Pires Garcia Oliveira

**ANÁLISE *HIGH-THROUGHPUT* DE MONÓCITOS EM PACIENTES
COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Presidente da banca: Profa. Dra. Karina Inacio Carvalho

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Luciana Cavaleiro Marti

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Dr. Ricardo Weinlich

Membros suplentes:

Dra. Filipa Blasco

Prof. Dr. Mario Lenza

Aprovada em: 23/02/2024.

Agradecimentos

A meus pais por me oferecerem todo o amparo necessário para que eu chegasse até onde estou, sem eles eu não seria a pessoa que hoje me tornei.

A minha orientadora, Karina Carvalho, pelos anos de apoio e ensinamentos que me levaram a construir meu caráter científico e pessoal.

A todos do laboratório, que me acompanharam na rotina do laboratório, me ensinando, discutindo e me ajudando a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein por toda a infraestrutura, e pelos alunos e docentes que fazem parte do nosso dia a dia.

A Pós-Graduação por fornecer todo o amparo burocrático e na resolução de dúvidas durante esses anos de doutorado.

A todos aqueles que passaram ao meu lado nos últimos anos me apoiando, me mostrando o lado bom das coisas, me incentivando a sempre ser uma pessoa melhor e a seguir em frente pois o mundo é grande e as possibilidades são infinitas.

“Presentemente eu posso me considerar um sujeito de sorte”
(Belchior)

Sumário

Agradecimentos.....	v
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xv
Resumo	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Crohn	2
1.2 Monócitos na doença de Crohn.....	5
1.3 Objetivo	9
2 MÉTODOS	10
2.1 Abordagens de análise no banco de dados de <i>bulk</i> RNA-seq.....	10
2.2 Análise dos dados de transcriptoma de <i>single cell RNA sequencing</i>	10
2.3 Pré-processamento dos dados (controle de qualidade)	12
2.4 Normalização dos dados	13
2.5 Determinação da dimensionalidade dos dados	13
2.6 Anotação dos <i>clusters</i>	14
2.7 Integração dos dados e análise de <i>Differentially expressed genes</i>	14
2.8 Análises estatísticas	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Resultados dos dados de <i>bulk</i> RNA-seq	17
3.2 Caracterização dos monócitos em indivíduos com e sem doença de Crohn a partir de dados de <i>single cell RNA sequencing</i>	18
3.3 Proporções de monócitos CD14 e CD16 no sangue e no tecido intestinal na doença de Crohn.....	18
3.4 Genes inflamatórios diferencialmente expressos em monócitos CD14 e CD16 circulantes na doença de Crohn	20
3.5 Clusterização de genes inflamatórios em monócitos CD14 circulantes e suas vias associadas na doença de Crohn	24
3.6 Identificação de <i>clusters</i> de genes inflamatórios em monócitos CD16 circulantes na doença de Crohn	28

3.7 Comparação de genes diferencialmente expressos em monócitos CD14 e CD16 no tecido intestinal na doença de Crohn	32
3.8 Caracterização de genes envolvidos no recrutamento celular e na inflamação em monócitos CD14 na doença de Crohn.....	36
3.9 Expressão diferencial de genes inflamatórios em monócitos CD16 teciduais na doença de Crohn.....	39
3.10 Análise de <i>single cell RNA sequencing</i> revela genes específicos e comuns de monócitos CD14 e CD16 na doença de Crohn.....	43
4 DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÕES	59
6 APRESENTAÇÃO DO ARTIGO	60
7 MÉTRICAS	61
7.1 Métricas do periódico	61
7.1.1 Fator de impacto.....	61
7.2 Métricas do artigo	61
7.2.1 Citações.....	61
7.2.2 Altimetria	62
7.3 Métricas do autor	62
7.3.1 Redes científicas	62
7.3.2 Trabalhos publicados.....	63
7.3.3 Mediana do fator de impacto dos trabalhos publicados.....	63
7.3.4 Citações recebidas	64
7.3.5 <i>H-index</i> e m-quociente.....	64
8 ANEXOS.....	66
9 REFERÊNCIAS	77
Abstract	
Apêndice	

Lista de figuras

- Figura 1.** Caracterização dos bancos de dados PREDICT CD, PREDICT FGID, GSE134809 e GSE150728 de *single cell* RNAseq, segundo o número de indivíduos que tiveram amostras coletadas, o sexo, o tipo de tecido coletado, a idade, ser ou não diagnosticado com a doença de Crohn e o número de células sequenciadas na metodologia de *single cell* RNAseq12
- Figura 2.** Pipeline de análise dos *datasets* de *single cell RNA sequencing*. O pipeline consiste em cinco etapas principais: pré-processamento, clusterização, anotação celular, integração e análise dos genes diferencialmente expressos. Para cada etapa, foram utilizadas as funções do pacote Seurat (v4.3) para o ambiente R, seguindo as recomendações dos autores. Os dados de *single cell RNA sequencing* foram obtidos dos bancos de dados PREDICT CD, PREDICT FGID, GSE134809 e GSE15072816
- Figura 3.** Proporções de células CD14 e CD16 no sangue periférico. Ilustra as proporções de células CD14 e CD16 no sangue periférico de indivíduos portadores e não portadores da doença de Crohn. No eixo 'y' está representado a porcentagem enquanto os números dentro das barras representam o valor absoluto de células CD14 ou CD16 nos indivíduos. Teste de Chi-quadrado rejeitou a H_0 ($p < 0,05$), demonstrando que há dependência da proporção de células de acordo com o grupo de indivíduos19
- Figura 4.** Proporções de células CD14 e CD16 no tecido intestinal. Ilustra as proporções de células CD14 e CD16 no tecido intestinal de indivíduos portadores e não portadores da doença de Crohn. No eixo 'y' está representado a porcentagem enquanto os números dentro das barras representam o valor absoluto de células CD14 ou CD16 nos indivíduos20
- Figura 5.** Genes diferencialmente expressos em monócitos CD14+ e CD16+ no sangue periférico. Ilustra os genes diferencialmente expressos encontrados a partir da comparação das células (A) CD14+ do sangue periférico e (B) CD16+ do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Crohn e não portadores. Foram analisadas a expressão de 7323 células CD14+ e de 2143 células CD16+ de ambos os grupos de indivíduos. Utilizando o teste estatístico de Wilcoxon estão marcados em vermelho os genes que apresentaram $p < 0,05$ e valor de $\log_2 \text{fold change} > 0,5$ (*upregulated*), enquanto em azul estão os genes que apresentaram $p < 0,05$ e valor de $\log_2 \text{fold change} < -0,5$ (*downregulated*)22

Figura 6. Número de genes inflamatórios em relação aos genes diferencialmente expressos totais no sangue periférico. Em azul o número de genes diferencialmente expressos significativos, ou seja, com $p < 0,05$ e valor de $\log_2 \text{fold change} > 0,5$, enquanto a barra vermelha ilustra o número de genes inflamatórios segundo as vias mapeadas no *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Em monócitos CD14+ do sangue periférico (CD14 S) temos 11 genes inflamatórios (13,9%) de 79 genes diferencialmente expressos significativos, enquanto nos monócitos CD16+ do sangue periférico (CD16 S) temos 8 genes inflamatórios (25,8%) de 31 genes diferencialmente expressos significativos....23

Figura 7. *Heatmap* da expressão gênica dos 11 genes associados à resposta inflamatória em células CD14+ no sangue periférico. O *heatmap* ilustra a expressão gênica (valores $\log_2$ normalizados) dos 11 genes inflamatórios encontrados em monócitos CD14+ do sangue periférico. Cada coluna presente no *heatmap* corresponde a expressão de uma célula analisada no sequenciamento de RNA *single cell*. De cima para baixo, as barras bicolores indicam a qual tipo de paciente a coluna pertence, sendo agrupadas em células de pacientes portadores da doença de Crohn ou não portadores. Da esquerda para a direita, as barras coloridas indicam a qual cluster aquele grupo de células pertence de acordo com o padrão de expressão gênica dos genes escolhidos, descritos na coluna da direita. Para a clusterização com base na expressão gênica foi utilizado o método euclidiano de clusterização completa25

Figura 8. *Heatmap* da expressão gênica dos 8 genes associados à resposta inflamatória em células CD16+ no sangue periférico. O *heatmap* ilustra a expressão gênica (valores $\log_2$ normalizados) dos 8 genes inflamatórios encontrados em monócitos CD14+ do sangue periférico. Cada coluna presente no *heatmap* corresponde a expressão de uma célula analisada no sequenciamento de RNA *single cell*. De cima para baixo, as barras bicolores indicam a qual tipo de paciente a coluna pertence, sendo agrupadas em células de pacientes portadores da doença de Crohn ou não portadores. Da esquerda para a direita, as barras coloridas indicam a qual cluster aquele grupo de células pertence de acordo com o padrão de expressão gênica dos genes escolhidos, descritos na coluna da direita. Para a clusterização com base na expressão gênica foi utilizado o método euclidiano de clusterização completa29

Figura 9. Genes diferencialmente expressos em monócitos CD14+ e CD16+ no tecido intestinal. Ilustra os genes diferencialmente expressos encontrados a partir da comparação das células (A) CD14+ do tecido intestinal e (B) CD16+ do intestinal de indivíduos portadores da doença de Crohn e não portadores. Foram analisadas a

expressão de 8310 células CD14+ e de 2143 células CD16+ de ambos os grupos de indivíduos. Utilizando o teste estatístico de Wilcoxon estão marcados em vermelho os genes que apresentaram valor-p ajustado $<0,05$ e valor de $\log_2 \text{ fold change} >0,5$ (*upregulated*), enquanto em azul estão os genes que apresentaram valor-p ajustado $<0,05$ e valor de $\log_2 \text{ fold change} < -0,5$ (*downregulated*).....34

Figura 10. Número de genes inflamatórios em relação aos genes diferencialmente expressos totais no tecido intestinal. Em azul o número de genes diferencialmente expressos significativos, ou seja, com valor-p ajustado $<0,05$ e valor de $\log_2 \text{ fold change} >0,5$, enquanto a barra vermelha ilustra o número de genes inflamatórios segundo as vias mapeadas no *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Em monócitos CD14+ do intestino (CD14 I) temos 13 genes inflamatórios (26,5%) de 49 genes diferencialmente expressos significativos, enquanto nos monócitos CD16+ do intestino (CD16 I) temos 15 genes inflamatórios (23,8%) de 63 genes diferencialmente expressos significativos....35

Figura 11. *Heatmap* da expressão gênica dos 13 genes associados à resposta inflamatória em células CD14+ no tecido intestinal. O *heatmap* ilustra a expressão gênica (valores $\log_2$ normalizados) dos 13 genes inflamatórios encontrados em monócitos CD14+ do tecido intestinal. Cada coluna presente no *heatmap* corresponde a expressão de uma célula analisada no sequenciamento de RNA *single cell*. De cima para baixo, as barras bicolores indicam a qual tipo de paciente a coluna pertence, sendo agrupadas em células de pacientes portadores da doença de Crohn ou não portadores. Da esquerda para a direita, as barras coloridas indicam a qual *cluster* aquele grupo de células pertence de acordo com o padrão de expressão gênica dos genes escolhidos, descritos na coluna da direita. Para a clusterização com base na expressão gênica foi utilizado o método euclidiano de clusterização completa37

Figura 12. *Heatmap* da expressão gênica dos 15 genes associados à resposta inflamatória em células CD16+ no tecido intestinal. O *heatmap* ilustra a expressão gênica (valores $\log_2$ normalizados) dos 15 genes inflamatórios encontrados em monócitos CD16+ no tecido intestinal. Cada coluna presente no *heatmap* corresponde a expressão de uma célula analisada no sequenciamento de RNA *single cell*. De cima para baixo, as barras bicolores indicam a qual tipo de paciente a coluna pertence, sendo agrupadas em células de pacientes portadores da doença de Crohn ou não portadores. Da esquerda para a direita, as barras coloridas indicam a qual *cluster* aquele grupo de células pertence de acordo com o padrão de expressão gênica dos genes escolhidos, descritos na coluna

da direita. Para a clusterização com base na expressão gênica foi utilizado o método euclidiano de clusterização completa40

Figura 13. Genes inflamatórios expressos em cada tipo celular e tecido analisado. Estão representados na figura os genes inflamatórios que tiveram as vias celulares avaliadas ao longo dos resultados e discussão. Da esquerda para direita temos os genes sendo expressos no sangue periférico por células CD14 ou por células CD16, no meio estão os genes que são comuns as populações de monócitos em ambos os tecidos avaliados, e na direita temos representados os genes sendo expressos no tecido intestinal por células CD14 ou CD1644

Lista de tabelas

Tabela 1. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>CYBB</i> e <i>MCL1</i>) do <i>cluster</i> 1 encontrado em monócitos CD14+ do sangue periférico	26
Tabela 2. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>TNFSF13B</i> , <i>PF4</i> , <i>PPBP</i> , <i>CTSB</i> , <i>LY96</i> , <i>POLR2L</i>) do <i>cluster</i> 2 encontrado em monócitos CD14+ do sangue periférico	27
Tabela 3. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>S100A8</i> , <i>FOS</i> , <i>VCAN</i>) do <i>cluster</i> 3 encontrado em monócitos CD14+ do sangue periférico	28
Tabela 4. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>HLA-DPB1</i> , <i>CD74</i>) do <i>cluster</i> 4 encontrado em monócitos CD16+ do sangue periférico	30
Tabela 5. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>HSPB1</i> , <i>C1QB</i> , <i>C1QA</i>) do <i>cluster</i> 5 encontrado em monócitos CD16+ do sangue periférico	31
Tabela 6. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>IFI30</i> , <i>PECAM</i> , <i>CD68</i>) do <i>cluster</i> 6 encontrado em monócitos CD16+ do sangue periférico	32
Tabela 7. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>SERPINA1</i> , <i>S100A8</i> , <i>S100A9</i>) do <i>cluster</i> 1 encontrado em monócitos CD14+ do tecido intestinal	38
Tabela 8. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>CXCL10</i> , <i>EREG</i> , <i>CXCL9</i> , <i>CCL18</i> , <i>INHBA</i> , <i>FLNA</i> , <i>FGR</i> , <i>CXCL11</i> , <i>TAP1</i> , <i>GBP5</i>) do <i>cluster</i> 2 encontrado em monócitos CD14+ do tecido intestinal	39
Tabela 9. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>CXCL10</i> , <i>CXCL9</i>) do <i>cluster</i> 3 encontrado em monócitos CD16+ do tecido intestinal	41
Tabela 10. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>IRF</i> , <i>IL32</i> , <i>GBP5</i> , <i>TAP1</i> , <i>EREG</i> , <i>IL1RN</i> , <i>CLEC4E</i> , <i>NFKB1</i> , <i>CCL19</i> , <i>CCR7</i>) do <i>cluster</i> 4 encontrado em monócitos CD16+ do tecido intestinal	42

Tabela 11. Processos biológicos encontrados na base de dados do <i>Gene Ontology</i> associados aos genes (<i>AREG</i> , <i>S100A9</i> , <i>SERPINA</i>) do <i>cluster</i> 5 encontrado em monócitos CD16+ do tecido intestinal	43
--	----

Lista de abreviaturas

CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
DCrohn	Doença de Crohn
DEG	Genes diferencialmente expressos (<i>Differentially expressed gene</i>)
DII	Doenças inflamatórias intestinais
GO	<i>Gene Ontology</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILC	Células inatas do sistema imune
JAK	<i>Janus kinase</i>
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
scRNA-seq	<i>Single cell RNA sequencing</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th17	Célula T helper 17
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>

Resumo

Introdução: Coletivamente classificadas como doenças inflamatórias intestinais, são patologias que afetam o sistema gastrointestinal provocando um quadro de inflamação crônica, sendo a doença de Crohn uma destas patologias. A doença de Crohn pode atingir qualquer parte do sistema gastrointestinal, da boca ao ânus podendo evoluir para inflamação transmural grave envolvendo toda espessura da parede intestinal. Sintomas como diarreia com presença de sangue, dor abdominal, perda de peso e suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores são comuns. O sistema imunológico atua no sistema gastrointestinal promovendo a tolerância contra antígenos comensais e do próprio alimento. A doença de Crohn se manifesta devido à quebra no mecanismo de tolerância e ao consequente desenvolvimento de respostas inflamatórias exacerbadas. Apesar do envolvimento do sistema imune na patologia, a etiologia destas doenças ainda permanece desconhecida. **Objetivos:** Identificar que subpopulações de monócitos circulantes e teciduais possam ser determinantes na progressão da cronicidade da doença de Crohn. **Métodos:** Foram selecionados 4 *datasets* para análise (PREDICT 2021:CD, PREDICT 2021:FGID, GSE134809, GSE150728), a quais foram realizadas seguindo o *pipeline* Seurat. Esses *datasets* foram anotados automaticamente com o pacote Azimuth, integrados e realizadas correções do efeito de lote, para posterior análise de genes diferencialmente expressos. **Resultados:** Nossos achados demonstraram vias semelhantes alteradas tanto no sangue quanto no tecido, entretanto alguns genes específicos de cada tecido foram encontrados. Monócitos circulantes tanto CD14 quanto CD16, apresentaram alterações em vias relacionadas à sinalização por quimiocinas, resposta frente a estímulos bacterianos, sinalização da resposta adaptativa e morte celular. Já no tecido nós identificamos alterações em vias de sinalização por quimiocinas, resposta a produtos bacterianos, sinalização a células dendríticas e vias de morte alteradas. **Conclusões:** Nossos dados sugerem uma similaridade entre os monócitos circulantes e teciduais, ainda que possuam assinaturas gênicas específicas de cada tecido. Por fim, a análise destes quatro bancos de dados sugere um papel central dos monócitos CD14 e CD16 na inflamação tecidual, recrutamento de células inflamatórias e alteração na sobrevivência celular dentro do microambiente intestinal inflamado.

Descritores: Sistema digestório; Células mieloides; Doenças inflamatórias intestinais; Doença de Crohn

1 INTRODUÇÃO

O sistema gastrointestinal (SGI) é formado pela cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus. A função do sistema gastrointestinal é digerir e absorver os alimentos e, em seguida, excretar os resíduos em todo seu comprimento podemos observar uma similar organização tecidual, sendo dividido em mucosa, submucosa, muscular e serosa. Cada uma destas camadas possui papel fundamental para o correto funcionamento. No presente trabalho iremos olhar para a mucosa e submucosa, local onde ocorre grande parte da absorção de nutrientes e que é afetado pelas doenças intestinais. As doenças do SGI podem afetar qualquer parte, da boca ao ânus, e doenças intestinais inflamatórias (DII) possuem grande importância para a saúde global.⁽¹⁾

Doenças inflamatórias intestinais, são alterações inflamatórias crônicas que afetam seletivamente o SGI,^(2,3) sendo a doença de Crohn (DCrohn) e a colite ulcerativa duas importantes patologias classificadas como DIIs. A DCrohn pode atingir qualquer parte do SGI, da boca ao ânus podendo evoluir para inflamação transmural grave envolvendo toda espessura da parede intestinal.⁽⁴⁾ A colite ulcerativa por sua vez, diferentemente da DCrohn, atinge a mucosa superficial somente do cólon e do reto com evidências de ulceração.^(5,6) Sintomas como diarreia com presença de sangue, dor abdominal e perda de peso são comuns entre as duas doenças, sendo que o diagnóstico diferencial é majoritariamente por exames clínicos.^(2,3)

As DIIs impactam consideravelmente a saúde da população global. Mundialmente as DIIs somavam 3,32 milhões de casos em 1990, já em 2019 este número aumentou para 4,9 milhões de casos, apresentando assim um aumento de 47,45% no número de casos reportados pelo globo, apesar da prevalência ter caído de 73,23 por 100.000 habitantes em 1990 para 59,25 por 100.000 habitantes em 2019. Em 2019 os países que mais apresentaram indivíduos diagnosticados foram Estados Unidos e China, com 911.405 e 762.890 casos respectivamente, enquanto os países da Europa ocidental somaram juntos 1,03 milhões de casos em 2019. Ademais, existe um corte de idade e sexo nestes pacientes, as pessoas entre 50 e 54 anos de idade fazem parte do grupo etário com maior prevalência da doença, sendo seguidas pelo grupo etário de 60 a 64 anos, enquanto as mulheres entre 1990 e 2019 foram mais acometidas pela doença do que os homens.⁽⁷⁾ No Brasil temos certa defasagem de dados acerca das DIIs, sendo

a mais presente nos bancos de dados a DCrohn.⁽⁸⁻¹²⁾ Entretanto em São Paulo podemos observar o aumento da prevalência da DCrohn, segundo Victoria et al.⁽¹³⁾ a prevalência era de 5,65 na primeira década dos anos 2000, sendo que no período de 2012-2015 este número subiu para 24,5 casos a cada 100.000 habitantes.⁽¹⁴⁾

Apesar do número alarmante e de casos de DIIs, a etiologia destas doenças ainda é desconhecida e os aspectos imunológicos envolvidos na patologia permanecem obscuros, abrindo assim um campo promissor para pesquisas à despeito dos fatores relacionados ao desenvolvimento de respostas inflamatórias exacerbadas.^(15,16)

1.1 Doença de Crohn

A DCrohn possui sintomas bem estabelecidos, acometendo qualquer parte do SGI, da boca ao ânus podendo evoluir para inflamação transmural grave envolvendo toda espessura da parede intestinal com granulomas assimétricos e descontínuos, hiperplasia focal linfóide e fibrose intestinal.^(4,17) Sintomas como diarreia com presença de sangue, dor abdominal, perda de peso e suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores são sintomas da DCrohn,⁽²⁾ porém o diagnóstico é dado utilizando parâmetros clínicos, histológicos e endoscópicos⁽¹⁸⁾ visto o acometimento do tecido intestinal de forma agressiva decorrente da inflamação transmural.

No passado, a DCrohn foi considerada uma doença autoimune, mas as concentrações de autoanticorpos encontradas na maioria dos pacientes foram muito inferiores às que se esperaria em uma patologia primariamente autoimune,⁽¹⁹⁾ enquanto que autores demonstram que o sistema imune não age contra o tecido intestinal, mas sim contra a microbiota intestinal com consequente liberação de citocinas e uma resposta prejudicial mediada pela presença de TNF- α , IL-23 e IL-17.⁽²⁰⁻²⁴⁾ Em acordo, dados da literatura têm destacado a presença de níveis elevados de IL-17 em biópsias de indivíduos com DCrohn.⁽²⁵⁻²⁸⁾

Na DCrohn é possível observarmos alterações na microbiota intestinal, alterações estas que podem ser iniciadoras ou resultado da resposta inflamatória desregulada. Estudos anteriores demonstraram mudanças na composição e na função metabólica da microbiota intestinal de pacientes com DCrohn. Um dos aspectos mais relevantes é a redução na produção de ácidos graxos de cadeia curta,

que são importantes moléculas para a regulação da resposta imune, apresentando ação anti-inflamatórias e imunomoduladores.^(29,30) No entanto, apesar da importância para o quadro clínico da doença, aspectos desta interação hospedeiro-microbiota ainda não estão totalmente elucidados, deixando assim dúvidas quanto a quais tipos celulares podem estar envolvidos nesta interação e quais os processos que podem levar ao desbalanço da microbiota.

Apesar das lacunas a despeito da etiologia da doença, alguns tratamentos já estão bem estabelecidos na prática clínica. Atualmente os tratamentos têm focado em terapias biológicas com anticorpos monoclonais tendo como alvos citocinas inflamatórias como o *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), interleucina (IL) IL-12 e IL-23, visto o papel importante destas citocinas na patogênese de DCrohn.⁽³¹⁻³⁶⁾ Nesse sentido, as abordagens terapêuticas envolvendo citocinas têm focado também nas subunidades que formam tais mediadores inflamatórios, como a subunidade p40 que compõem a IL-23 e a IL-12.⁽³⁴⁻³⁶⁾ Ademais, no que se refere à IL-23, existem estudos focando na inibição da sua outra subunidade, a p19, por meio de terapias com tildrakizumab/guselkumab/brazikumab/risankizumab.⁽³⁶⁻³⁹⁾ Entretanto, a deficiência da subunidade p40 tem favorecido o risco de infecções por *Micobacterium*, *Salmonella* e *Candida*.^(34,35) Ainda no campo de alvos terapêuticos, a IL-17 tem chamado a atenção por também estar envolvida na patogênese de DCrohn.^(26,40,41) Pacientes com DCrohn receberam anti-IL-17 (Secukinumab) na tentativa de controlar a doença. Porém, os resultados foram desastrosos com consequente piora da doença.⁽⁴²⁾ Uma hipótese é de que a IL-17 atua na proteção da barreira da mucosa intestinal e também na modulação de células T regulatórias (Tregs).⁽²²⁾ No Brasil existe uma gama de terapias biológicas regulamentadas e disponíveis para uso,^(43,44) entretanto o uso do anti-TNF- α prevalece. O anticorpo monoclonal anti-TNF- α , é um anticorpo quimérico de humano e camundongo desenvolvido para induzir baixa resposta frente a porção Fc e alta afinidade da porção Fab para o TNF- α .⁽³¹⁾ O uso deste tratamento é preconizado para casos moderados a graves, que não respondem ao tratamento com corticoides, além de ser bastante utilizado para a manutenção do quadro de remissão da doença.⁽⁴⁴⁾

Além de mediadores solúveis da resposta imune, devemos elencar também vias intracelulares de proteínas acessórias com importante atuação sobre a expressão gênica de fatores de transcrição e mediadores relacionados à resposta imune. As proteínas da família *Janus kinase* (JAK) são associadas a vias intracelulares de resposta imune, a sinalização por estas vias pode induzir a produção de citocinas do

perfil Th2, como IL-2 e IL-4, de citocinas do perfil Th1, como IL-6 e interferon (IFN), ou até mesmo levar a transcrição de fatores nucleares como *signal transducer and activator of transcription* (STAT) STAT1, STAT3 e STAT5.^(45,46) Dado a ampla gama de possibilidades que as JAKs podem sinalizar dentro da resposta imune, estas proteínas estão sendo alvos de desenvolvimento de nova terapia para DCrohn, por meio do uso de inibidores das vias de JAK1, JAK2 e JAK3. Apesar de já ter sido aprovada para uso na colite ulcerativa, ainda não houve a liberação para o tratamento na DCrohn devido a resultados não satisfatórios, como baixa indução de remissão ou desenvolvimento de resistência.^(47,48)

Apesar dos avanços, vias intracelulares ainda são pouco reconhecidas na DCrohn, e o melhor entendimento destas poderia servir para novos alvos terapêuticos.

O avanço do uso de terapias biológicas possibilitou melhoras nas condições de vida, entretanto o tratamento não é 100% eficaz. O uso dessas terapias possui algumas falhas na indução de remissão da doença, alguns respondem inicialmente com posterior *flare* da doença, outros nem se quer respondem à terapia,^(32,49,50) além de efeitos colaterais que podem favorecer complicações infecciosas causadas por patógenos como *Candida*, *Mycobacterium* e *Salmonella*.^(22,34,35)

A DCrohn atinge um sistema bastante complexo, formado por diversos tipos celulares, uma ampla gama de microrganismos comensais, tendo assim diferentes fatores na homeostasia intestinal. Um destes fatores é o sistema imunológico, que atua no SGI promovendo a tolerância contra antígenos comensais e do próprio alimento. Esse processo ocorre por meio de anticorpos IgA específicos produzidos por células B e a ação regulatória do sistema imune de células T regulatórias (Tregs). Apesar disso, as DIIs se manifestam devido à quebra neste mecanismo de tolerância a antígenos alimentares e da própria microbiota, levando assim ao consequente desenvolvimento de respostas inflamatórias exacerbadas.^(51–53) O uso inadequado de drogas como anti-inflamatórios e antibióticos associadas à ocorrência de infecções gastrointestinais podem alterar a microbiota intestinal e levar ao desenvolvimento de DIIs. Além destes fatores, a amamentação e poluição ambiental gerada nas grandes cidades são fatores que podem ser associados a iniciação de DIIs.^(54–58)

1.2 Monócitos na doença de Crohn

Os monócitos são células mononucleares capazes de reconhecer e eliminar patógenos, sendo, com os neutrófilos, importantes células de defesa do organismo frente a microrganismos invasores. Monócitos inicialmente descritos como uma única população composta por células mononucleares fagocitárias identificadas principalmente por sua expressão de CD14 na superfície celular, mas estudos posteriores levaram a uma subclassificação de 3 subpopulações também com base na expressão de CD16: monócitos clássicos (CD14⁺ CD16⁻) com atividade fagocítica e envolvidos na resposta imune inata, monócitos intermediários (CD14⁺ CD16⁺) responsáveis pela secreção de citocinas e apresentação de antígenos, e monócitos não-clássicos (CD14⁻ CD16⁺) que estão associados à fagocitose mediada por Fcγ.^(59–62) No entanto, apesar das 3 populações bem estabelecidas em relação aos seus marcadores, a lista de funções destas subpopulações continua a aumentar.

Os monócitos por fazerem parte desta primeira linha de defesa do organismo, possuem papel importante na produção de mediadores da resposta imune. Após ativados, os monócitos podem liberar citocinas, bem como geração de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio. Citocinas como o TNF-α e IL-1β são importantes no processo inflamatório, enquanto outras citocinas, como a IL-10 e *transforming growth factor beta* (TGF-β), são consideradas fatores de desativação celular.⁽⁶³⁾ O TNF-α e IL-1β são importantes para a fisiologia intestinal, por serem responsáveis pela ativação celular e combate a infecções bacterianas.^(64–67) Apesar do TGF-β possuir ação contrária às citocinas mencionadas anteriormente, sua produção é importante para a manutenção da homeostase intestinal. Kelly et al.⁽⁶⁸⁾ demonstraram que monócitos que expressam a integrina αvβ8 produzem esta citocina e ao migrarem para o intestino se tornam macrófagos anti-inflamatórios. Já no quadro patológico da inflamação intestinal, os monócitos circulantes e macrófagos teciduais que não expressam esta integrina tem produção diminuída do TGF-β na sua forma ativa. Outros autores corroboram esta hipótese demonstrando a presença de monócitos não-clássicos no intestino produzindo TGF-β e sua importância para a manutenção de macrófagos anti-inflamatórios e da homeostase intestinal.⁽⁶⁹⁾

Além da produção de mediadores solúveis da resposta imune, a expressão de receptores de superfície pelas células do sistema imune é de suma

importância para a ativação da resposta imune frente a patógenos. Dentre eles, podemos destacar o *toll like receptor* (TLR) TLR-4, que possui como agonista principal o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, sendo assim um importante sinalizador de superfície para o combate às infecções mais comuns, como as causadas por *E. coli*.⁽⁷⁰⁾ Devido a importante interação do TLR-4 com produtos bacterianos, um polimorfismo do gene TLR4 vem sendo associado ao risco aumentado para o desenvolvimento de DIIs, principalmente na população caucasiana.⁽⁷¹⁾ Após ativação destas células por estes tipos de receptores, pode ocorrer à liberação de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, bem como geração de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, mediadores inflamatórios importantes para a resposta imune.⁽⁶⁵⁾

Além dos TLRs, outro marcador de superfície é o CD163. O CD163 é um receptor de superfície encontrado em células fagocíticas, tais como monócitos e macrófagos, com grande afinidade com complexos de haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb), sendo um dos receptores responsáveis pela fagocitose e eliminação deste subproduto da hemólise.⁽⁷²⁾ Este receptor possui função anti-inflamatória ao se ligar ao complexo Hp-Hb e desencadear a produção de metabólitos associados ao grupo heme. Porém, o CD163 pode ser associado a produção de TNF- α e IL-1 β induzida por bactérias em monócitos circulantes e teciduais.⁽⁷³⁾ Além da sinalização inflamatória, o CD163 faz parte do processo de maturação dos macrófagos intestinais e que possuem papel importante na homeostasia do tecido, sendo responsáveis por conter processos inflamatórios locais, tendo papel importante nas DIIs.⁽⁷⁴⁾ Ademais, monócitos clássicos, CD14⁺ CD163^{dim/-}, estão envolvidas na patogênese de DCrohn. Ogino et al.⁽⁷⁵⁾ e posteriormente Chapuy et al.,⁽⁶²⁾ demonstraram que tais células são produtoras de citocinas pró inflamatórias (IL-1 β , IL-17, IL-23) levando a polarização dos linfócitos ao perfil Th1/ Th17 e assim ao aumento dos *scores* e a severidade da doença. Ademais, análises genômicas realizadas por Gettler et al.,⁽⁷⁶⁾ demonstraram a superexpressão de genes relacionados a DCrohn em leucócitos, especialmente nas subpopulações de monócitos clássicos e não clássicos, associando assim tais populações celulares a patogênese desta doença.

Adicionando aos marcadores de superfície anteriormente citados, a presença de quimiorreceptores é de suma importância para a mobilização celular para sítios inflamados e tecidos de maturação. Nos monócitos podemos destacar o CCR2, um quimiorreceptor responsável pela mobilização destas células para a circulação,⁽⁷⁷⁾ mas também pela mobilização para sítios de inflamação, destacando seu papel na

DII.^(78,79) Outro importante quimiorreceptor é o CX3CR1, este é responsável pela mobilização celular e importante marcador de macrófagos intestinais capazes de responder a antígenos.⁽⁸⁰⁾ Juntamente com o CCR2, ambos os quimiorreceptores podem ser associados a células com perfil pró inflamatório, Bernardo et al.⁽⁵³⁾ demonstraram que células monocíticas CCR2⁺CX3CR1⁺ estavam aumentadas no intestino de pacientes portadores de DIIs, demonstrando assim a presença e importância destas células para a inflamação intestinal.

Na DCrohn, monócitos CD14⁺ apresentam-se reduzidos no sangue periférico sugerindo a migração dessas células para o SGI e manutenção da inflamação. Enquanto que, monócitos CD14⁺/CD16⁺ estão em maior número e a população CD16⁺ encontra-se estável no sangue periférico. Funcionalmente, essas subpopulações ainda não foram investigadas nas DIIs. O que se sabe é que monócitos de indivíduos com DCrohn expressam mais IL-1 β e CCL2 quando comparados à indivíduos saudáveis.^(81–84) Liu et al.⁽⁷⁹⁾ demonstraram o aumento da quantidade de células mononucleares no intestino de pacientes portadores de DIIs, entretanto não detalharam quais as populações que estão de fato elevadas no tecido inflamado e qual o padrão de expressão gênica destas células. O entendimento das funções de cada subpopulação conhecida se faz importante, para tal devemos não só olhar para a produção em si de citocinas, mas também para a capacidade de resposta.

Todo esse perfil de ativação celular, com alteração de expressão de receptores de superfície, e aumento da produção de mediadores da sinalização inflamatória citado anteriormente, além de afetar negativamente o bem-estar do indivíduo, pode levar as células imunes à exaustão. Na literatura está bem descrito o processo de deterioração da resposta imune de células T, conhecido também como exaustão celular, em doenças crônicas, como o câncer e a infecção por HIV, nas quais o sistema imune é constantemente estimulado com antígenos tumorais ou virais, levando assim a perda progressiva de funções efetoras, alterações metabólicas e aumento da expressão de receptores inibitórios como o PD1, CTLA4 e TIM3, acarretando assim a perda da resposta imune efetiva e consequente perda da capacidade de *clearance* da infecção viral ou crescimento tumoral.⁽⁸⁵⁾ Entretanto o processo de exaustão não está devidamente elucidado em células mononucleares fagocíticas. Pradhan et al. observaram em monócitos após repetidos estímulos com LPS, o aumento da expressão de CD38. Estas células também apresentavam diminuição dos níveis de NAD⁺, aumento de ROS e desregulação da cadeia respiratória, marcadores os quais podem levar ao

aumento de inflamação local.⁽⁸⁶⁾ Os autores concluem que monócitos ao expressarem CD38 apresentam um estado de exaustão. Diferentemente dos linfócitos, monócitos exaustos expressam CD38 em vez de PD1, CTLA4 e TIM3, possuindo assim um perfil diferenciado de exaustão celular.

Atualmente, apesar dos avanços no entendimento das populações celulares do sistema imune, e nas suas funções efetoras em diversas doenças, ainda existe uma lacuna de conhecimento a despeito das células do sistema imune e sua ação nas DIs, propiciando assim um campo fértil para se avançar na fronteira do conhecimento.

A utilização da tecnologia de sequenciamento de RNA trouxe avanços notáveis na ciência. Nos últimos anos com o advento da técnica de separação de células únicas (*single cell*) para terem seu fenótipo avaliado ou o conjunto de *messenger* RNA (mRNA) sequenciado, o entendimento das populações celulares mudou drasticamente. Estudos recentes utilizando de metodologias *single cell* vêm evidenciando novas funções e plasticidades dos monócitos, Boyette et al. demonstraram, a partir do sangue de indivíduos saudáveis, que monócitos, especialmente os não-clássicos, podem estar envolvidos ativamente na produção de IFN e no combate a infecções virais.⁽⁶¹⁾ Enquanto outros autores demonstram novos estados de transição entre monócitos e células dendríticas utilizando da técnica de *single cell* RNAseq.^(87,88) Apesar dos avanços no entendimento da biologia do monócito, estudos envolvendo a DCrohn, monócitos e técnicas de *single cell* ainda não são muito comuns na literatura. Chapuy et al. demonstraram que monócitos presentes no tecido inflamado de pacientes portadores da DCrohn estavam mais propensos a estimular o perfil de resposta Th17 de linfócitos,⁽⁶²⁾ apesar dos achados os autores não abordaram as possíveis diferenças entre as subpopulações clássica e não-clássica na doença. Portanto, além de fazerem parte do sistema imune que primeiro responde a estímulos inflamatórios, sua ampla gama de funções e plasticidade, se mostram serem células de grande importância para homeostasia da resposta imune. Mannick et al. observaram que monócitos provenientes de pacientes portadores da DCrohn apresentavam expressão alterada de genes relacionados a diferenciação celular, a sinalização mediada por lipídios, a remodelação dos filamentos de actina e tráfego vesicular, estes resultados levaram os autores do artigo a concluir que monócitos podem estar contribuindo para a patogênese. Entretanto, o estudo não pode elucidar quais subpopulações de monócitos possuem este perfil alterado de expressão gênica.⁽⁸⁹⁾ Mais recentemente, autores utilizando a metodologia

de *single cell RNA sequencing* (scRNA-seq), demonstraram que monócitos de pacientes portadores da doença possuem um perfil aumentado de expressão gênica, genes os quais estão relacionados a vias de sinalização por IFN, regulação positiva da produção de citocinas e resposta imune frente a bactérias, apresentando assim um perfil inflamatório.⁽⁹⁰⁾ Verstockt et al., também utilizando a técnica de scRNA-seq, demonstraram genes diferencialmente expressos (DEGs – *differentially expressed genes*) em monócitos e linfócitos T CD4. Estes DEGs estavam associados a resposta imune inflamatória, principalmente relacionada a sinalização por IL-1 β e TLR.⁽⁹¹⁾ O uso de metodologias complexas como o transcriptoma, *bulk* ou *single cell*, são importantes para podermos observar as populações celulares especializadas, e poder relacioná-las, ou não, com a doença. Este tipo de correlação nos permite entender melhor como a doença progrediu e como podemos elencar novos alvos terapêuticos.⁽⁹²⁾

Ademais, além do fator científico, existe o fator econômico e humano destas doenças, fator que possui papel importantíssimo na tomada decisões de condutas clínicas e práticas de saúde pública, as DII, aqui em especial a DCrohn, impactam consideravelmente na economia do mundo ocidental. Além dos gastos diretos com saúde, essas doenças geram gastos indiretos devido ao impacto na produtividade, queda na qualidade de vida e o surgimento de estigma social. Tais gastos que muitas vezes ultrapassam os gastos diretos no sistema de saúde.⁽⁹³⁾

Diante da importância anteriormente apresentada dos monócitos para a resposta inflamatória, e como primeira linha de defesa do sistema imune, a nossa hipótese é que subpopulações de monócitos circulantes possam ser determinantes na progressão da cronicidade da DCrohn, ademais, aumento de casos, o impacto social relatado por todo o mundo, a severidade da doença e tratamento nem sempre eficaz, demonstram que ainda existe uma lacuna a ser preenchida a despeito da resposta imune na DCrohn.

1.3 Objetivo

1. Avaliar monócitos circulantes e teciduais de pacientes portadores de doença de Crohn quanto a expressão e vias de ativação celular, a fim de evidenciar o papel nas doenças inflamatórias intestinais e estabelecer relação entre as populações celulares e o *status* da doença.

2 MÉTODOS

2.1 Abordagens de análise no banco de dados de *bulk* RNA-seq

As análises da expressão gênica de pacientes portadores de DCrohn, foi realizada como uma abordagem *in silico*, sendo dependente de dados disponíveis em biorrepositório e bancos de dados públicos. Para prosseguir com as análises *in silico*, foram utilizados dados disponíveis na plataforma IBD TaMMA (<https://ibd-meta-analysis.herokuapp.com/>) um portal *online* que conta com ferramentas de análise, *download* e visualização de *datasets* genômicos. A principal vantagem desta plataforma é que ela agrupa estudos de diversos consórcios e grupos de pesquisa, contendo um total de 3852 sequenciamentos de 26 estudos diferentes, sendo, portanto, bastante abrangente. Além disso, os dados dos diferentes estudos estão disponibilizados de forma padronizada, o que torna o acesso rápido e fácil e possibilita a formação de coortes utilizando dados de mais de um estudo, de forma multicêntrica. Isto permite o agrupamento de um número grande de indivíduos em um curto intervalo de tempo e a formação de uma coorte com pacientes de diferentes países, etnias, hospitais, etc. Os 3583 sequenciamentos de RNA presentes do banco de dados foram inicialmente filtrados utilizando o fastq-dump v2.11.0 com posterior checagem de qualidade utilizando FastQC v0.11.19, tendo o *reads* de baixa qualidade retirados antes da análise. Para o correto agrupamento e redução de variáveis de confusão que possam criar vieses nas análises, o banco de dados se utilizou do algoritmo ComBat para redução de vieses intrínsecos aos experimentos. A análise e correlação de vias intracelulares diferencialmente expressas foi feita por meio da análise de genes presentes na base de dados Gene Ontology (<https://geneontology.org>).

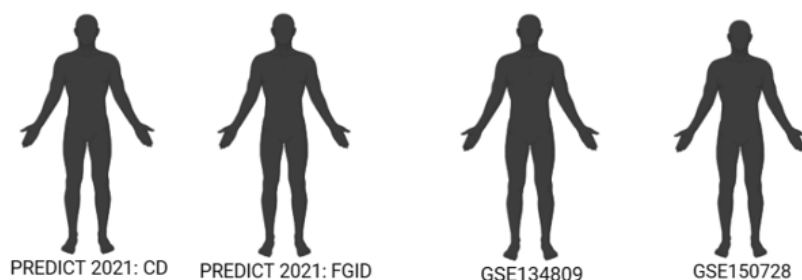
2.2 Análise dos dados de transcriptoma de *single cell* RNA sequencing

As análises de *single cell* (sc) RNA sequencing (RNAseq) foram realizadas utilizando 4 bancos de dados públicos: PREDICT 2021 CD, PREDICT 2021 FGID, GSE134809 e GSE150728 (Figura 1). O PREDICT 2021 CD é formado por amostras de tecido intestinal de 14 indivíduos sendo 8 homens e 6 mulheres portadores

da DCrohn, a média de idade é de 14 anos. O banco de dados contém o sequenciamento de 95.516 células, sendo que destas 6.615 são monócitos, que podem ser divididos em 5.301 monócitos CD14⁺ e 1.314 monócitos CD16⁺. O PREDICT 2021 FGID é formado por amostras de tecido intestinal de 13 indivíduos sendo 8 homens e 5 mulheres não portadores da DCrohn, e a média de idade é de 16 anos. Este banco de dados contém o sequenciamento de 71.787 células, sendo que destas 2.439 são monócitos, que podem ser divididos em 1.917 monócitos CD14⁺ e 522 monócitos CD16⁺. Já o GSE134809 é formado por amostras de tecido intestinal de 11 indivíduos e de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 9 indivíduos, sendo as amostras de CMSP provenientes dos mesmos indivíduos que foram retiradas as amostras de tecido, todos portadores da DCrohn. A média de idade é de 36 anos. O banco de dados contém o sequenciamento de 19.698 células teciduais, sendo que destas 1.399 são monócitos, que podem ser divididos em 1.092 monócitos CD14⁺ e 307 monócitos CD16⁺, enquanto no CMSP foram sequenciadas 20.145 células, sendo 6.497 monócitos, divididos em 5.269 monócitos CD14⁺ e 1.228 monócitos CD16⁺. Por fim, o GSE150728 é formado por amostras de CMSP de 6 indivíduos sendo 4 homens e 2 mulheres não portadores da DCrohn, a média de idade é de 45 anos. O banco de dados contém o sequenciamento de 16.627 células, sendo que destas 2.969 são monócitos, que podem ser divididos em 2.054 monócitos CD14⁺ e 915 monócitos CD16⁺.

O transcriptoma dos monócitos de sc-RNAseq dos pacientes e controles foram analisados utilizando o *workflow* do pacote Seurat em linguagem de programação R versão 4.3.0 (RStudio).

O *workflow* foi desenvolvido para análise e exploração de dados de sequência de RNA de célula única, utilizando métricas de controle de qualidade das células, identificação de *clusters* celulares e interpretação da heterogeneidade de células únicas e integração de diversos dados transcriptômicos. Esses pacotes foram utilizados pois permitem visualizações claras, atraentes e interpretáveis para serem facilmente utilizados por pesquisadores e abordagens *in silico*.⁽⁹⁴⁾ Inicialmente, o *download* dos *datasets* foi feito diretamente do *Single Cell* portal e do GEO Datasets. Os 4 *datasets* selecionados para análise, foram realizadas as etapas de *downstream* seguindo o tutorial Seurat versão 23 4.3.0.



	PREDICT CD	PREDICT FGID	GSE134809 intestino	GSE134809 CMSP	GSE150728 CMSP
n	14	13	11	9	6
Sexo	8 homens/ 6 mulheres	8 homens/ 5 mulheres	10 homens/4 mulheres		4 homens/ 2 mulheres
Tecido	Intestino	Intestino	Intestino	CMSP	CMSP
Média de idade (anos)	14	16	36		45
Doença de Crohn	+	-	+	+	-
Número total de células	95516	71787	19698	20145	16627
Número total de monócitos	6615	2439	1399	6497	2969
Número de monócitos CD14	5301	1917	1092	5269	2054
Número de monócitos CD16	1314	522	307	1228	915

CMSP: células mononucleares do sangue periférico.

Figura 1. Caracterização dos bancos de dados PREDICT CD, PREDICT FGID, GSE134809 e GSE150728 de *single cell* RNAseq, segundo o número de indivíduos que tiveram amostras coletadas, o sexo, o tipo de tecido coletado, a idade, ser ou não diagnosticado com a doença de Crohn e o número de células sequenciadas na metodologia de *single cell* RNAseq

2.3 Pré-processamento dos dados (controle de qualidade)

Exploramos as métricas de controle de qualidade (QC *metrics*)⁽⁹⁵⁾ e filtramos as células de cada *dataset* com base na visualização da função ViolinPlot. Células com expressão maior que 10% de genes mitocondriais foram removidas, pois essas células são associadas com perfil apoptótico ou de baixa qualidade celular, as células com mais de 40% de genes ribossomais também foram removidas, para evitar falsos positivos relativos a alta expressão basal de genes ribossomais. O número de genes únicos detectados em cada célula permite identificar que células de baixa

qualidade. Portanto, com base na visualização dos dados pela função `ViolinPlot`, filtramos entre 200 a 3000 genes. Por último, selecionamos o número de contagem atribuídas a cada gene em uma célula específica no mínimo de 200, evitando assim novamente células com baixa qualidade de leitura. A verificação da qualidade celular foi realizada por meio de uma análise de correlação utilizando a função `FeatureScatter` que irá desenhar uma regressão linear demonstrando a correlação entre os genes detectados e a quantidade de RNA aferida, valores de R próximos de 1 demonstram boa qualidade dos dados. O valor observado foi superior a 90% para todos os *datasets*, indicando uma ótima qualidade na filtragem das células. Após o processo de filtragem e controle de qualidade restaram para serem avaliadas o número total de células como apresentado na figura 1.

2.4 Normalização dos dados

Após a filtragem, aplicamos a normalização da expressão gênica utilizando a função `scTransform` para estabilizar a variância de dados de contagem molecular por uma regressão binomial negativa regularizada. Essa técnica remove com sucesso a influência das características nas análises a serem realizadas, preservando a heterogeneidade e relevância biológica, reunindo informações entre genes com abundâncias semelhantes para obter estimativas de parâmetros estáveis.^(96,97) A partir deste ponto podemos seguir para a determinação da dimensionalidade dos dados e anotação das células, para que assim possamos selecionar somente os monócitos que são o foco do presente trabalho.

2.5 Determinação da dimensionalidade dos dados

Utilizamos a função `ElbowPlot`, um método heurístico alternativo que gera um 'gráfico de cotovelo': uma classificação dos principais componentes com base na porcentagem de variância explicada por cada um. Para todos os *datasets*, observamos um 'cotovelo' ao redor do PC14-20, sugerindo que a maior parte do sinal verdadeiro é captado nos primeiros 20 PCs. Delimitar o número de PCs a serem utilizados é importante. O número de PCs serve para reduzir a dimensionalidade de um

conjunto de dados, preservando o máximo de informação possível. Isso é feito identificando as dimensões (ou seja, os componentes) ao longo das quais os dados estão mais dispersos, melhorando o modelo e a visualização dos dados. Assim nós utilizamos 20 como fator de dimensionalidade para a correta redução de dimensionalidade para o UMAP e posterior anotação dos *clusters*.⁽⁹⁸⁾

2.6 Anotação dos *clusters*

Foi utilizada a ferramenta Azimuth⁽⁹⁴⁾ para anotação automática de subpopulações imunes, onde utiliza-se um conjunto de dados de referência anotado para automatizar o processamento, análise e interpretação de um novo experimento de scRNAseq. É utilizado um *pipeline* de 'mapeamento baseado em referência' que insere uma matriz de contagem de expressão gênica em células individuais e realiza normalização, visualização, anotação de células. Para tanto utilizamos a função RunAzimuth nos nossos dados, com o parâmetro de referência como 'pbmcref', desta forma nossos dados serão anotados de acordo com os marcadores de expressão gênica dos tipos celulares presentes no CMSP. Nós utilizamos a visualização da anotação "predicted.celltype.l2" do pacote Azimuth para anotação dos monócitos e suas subpopulações CD14 e CD16 em cada *dataset* do presente estudo. A utilização da anotação "predicted.celltype.l2" fornece mais confiança, pois utiliza mais marcadores genéticos, que as células que estamos trabalhando são de fato as esperadas. Por fim, com base nessa anotação dos tipos celulares, selecionamos as duas subpopulações de monócitos, que serão integradas e analisadas.

2.7 Integração dos dados e análise de *differentially expressed genes*

Após a união dos *datasets*, utilizamos as funções SelectIntegrationFeatures, FindIntegrationAnchors e IntegrateData, funções todas pertencentes ao pacote Seurat, para integrar os dados e corrigir os efeitos de lote entre os diferentes *datasets*.⁽⁹⁹⁾ O uso de tal metodologia se fez necessário, pois observamos efeitos de lote entre os diferentes *datasets* de tecido intestinal e os diferentes *datasets* de CMSP.

A redução de dimensionalidade dos dados integrados pode ser vista de acordo com a separação de grupos portadores ou não portadores da doença (Apêndice 1, Figura Suplementar 1), e de acordo com a subpopulação de monócitos (Apêndice 1, Figura Suplementar 2), demonstrando assim que não há efeito de lote após integração. Após a integração, já tendo as células anotadas foi possível realizarmos a análise de DEGs, utilizamos a função FindMarkers, pertencente ao pacote Seurat, onde utiliza-se o teste estatístico não paramétrico de comparação entre dois grupos (Wilcoxon) para avaliar quais genes se diferem no grupo de indivíduos portadores da DCrohn comparando com o grupo não portador da DCrohn. Foram considerados como DEGs quando o valor-p ajustado foi $<0,05$. Genes *upregulated* (alta expressão) utilizamos o *threshold* de $\log_2$ fold change acima de 0,5, e genes *downregulated* (baixa expressão) $\log_2$ fold change menor que -0,5. A análise de vias biológicas Gene Ontology (GO) relacionadas aos genes escolhidos foi realizada utilizando-se o software Enrichr.⁽¹⁰⁰⁾ Utilizamos o banco de dados *Kyoto encyclopedia of genes and genomes* (KEGG) *human* para relacionar os genes com a resposta imune inflamatória. Por fim, os *heatmaps* foram gerados utilizando o pacote *pheatmap* para visualizarmos a expressão gênica de cada célula para cada um dos genes de interesse, ademais foi utilizado o parâmetro `cluster_rows=TRUE` agrupando assim os genes com expressão similar criando *clusters*. Em linhas gerais, o *pipeline* de análise está demonstrado na figura 2.

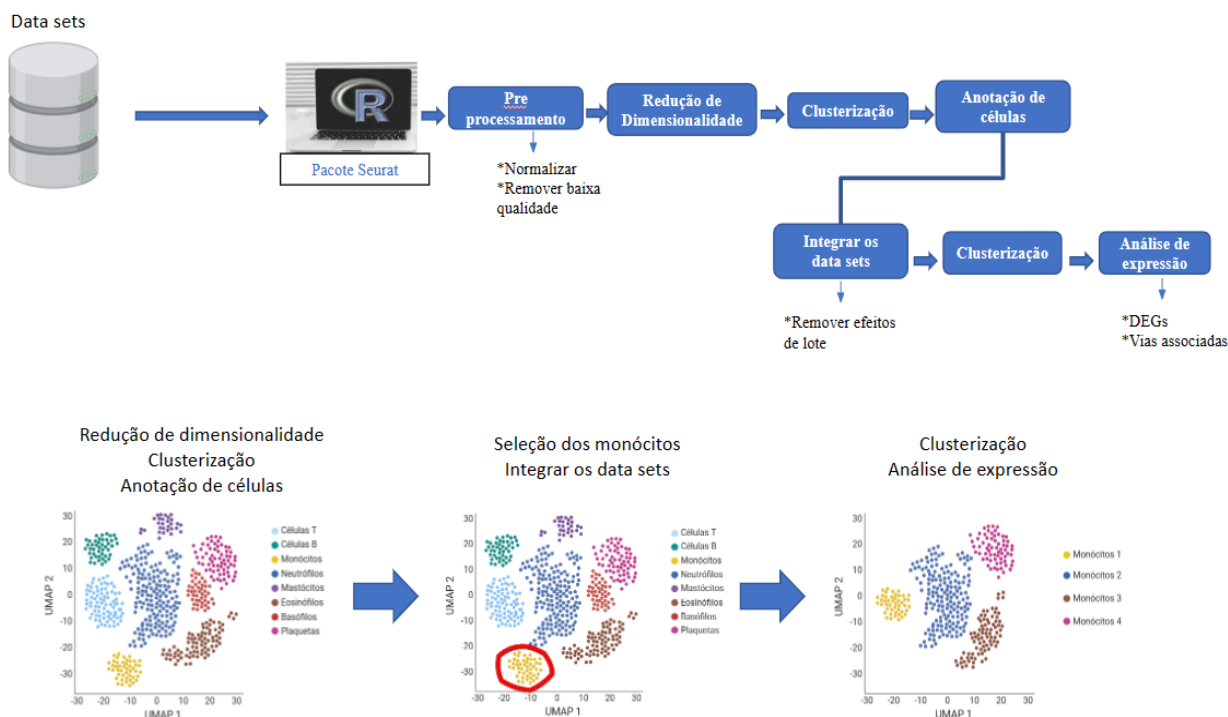


Figura 2. Pipeline de análise dos datasets de single cell RNA sequencing. O pipeline consiste em cinco etapas principais: pré-processamento, clusterização, anotação celular, integração e análise dos genes diferencialmente expressos. Para cada etapa, foram utilizadas as funções do pacote Seurat (v4.3) para o ambiente R, seguindo as recomendações dos autores. Os dados de single cell RNA sequencing foram obtidos dos bancos de dados PREDICT CD, PREDICT FGID, GSE134809 e GSE150728

2.8 Análises estatísticas

Os dados provenientes do *bulk* RNA sequencing de expressão de genes diferencialmente expressos foram considerados como *false discovery rate* (FDR) $< 0,00005$, e as vias diferencialmente expressas foram consideradas quando $FDR < 10^{-10}$. As comparações entre pacientes e grupo controle foram realizadas utilizando teste *t* com significância de $p < 0,05$.

Nos dados de single cell RNA sequencing, análise da quantidade de células no sangue circulante e no tecido, foi realizado o teste estatístico Chi-Quadrado (dados não paramétricos) do grupo de portadores da DCrohn em comparação ao grupo não portador de DCrohn, e estabelecemos o *p* significativo como menor que 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 Resultados dos dados de *bulk* RNA-seq

A DCrohn é uma doença complexa e que afeta diferentes ramos da resposta imune do paciente, como pudemos observar nas figuras presentes no anexo 1, há alterações nas vias de JAK, CASP e alterações na expressão de receptores de superfície como CD33 e CD38, em sua maioria, observadas nas células do sangue total, enquanto os monócitos, quando avaliados especificamente, não apresentaram diferenças significativas quanto a expressão gênica na comparação entre o grupo de pacientes e o grupo de saudáveis.

Estes resultados provenientes das análises de *bulk* RNA-seq sugerem que neste banco de dados de pacientes portadores de DCrohn as células imunes do sangue possuem maturação alterada decorrente da expressão de *CD33* e *CD38*, e possuem sinalização para sobrevivência pela diminuição da expressão de caspases da via de morte celular, podendo estar atuantes no processo inflamatório intestinal decorrente da patologia, porém sem a maturidade celular esperada. Ademais, nestes dados não observamos o papel mais específico dos monócitos na patologia, este grupo de células não apresentou diferenças estatísticas entre os pacientes e indivíduos saudáveis, porém ainda não podemos refutar nossa hipótese sendo que análises mais focadas na população de monócitos podem fornecer dados para aceitar ou refutar a participação destas células na patologia da DCrohn.

A análise de *bulk* RNA-seq possui limitações, sendo a maior delas a falta de especificidade e da capacidade de selecionar tipos celulares e avaliar somente a expressão gênica destes tipos escolhidos, portanto se faz necessário a utilização de dados de *single cell* RNA sequencing para que possamos adequadamente trabalhar com as diferentes populações de monócitos e assim melhor entender seus marcadores de expressão gênica.

3.2 Caracterização dos monócitos em indivíduos com e sem doença de Crohn a partir de dados de *single cell RNA sequencing*

Nossas análises de scRNA-seq foram realizadas utilizando 4 bancos de dados públicos: GSE134809, GSE150728, PREDICT 2021 CD, PREDICT 2021 FGID. Estes bancos de dados compreendem indivíduos com e sem o diagnóstico da DCrohn, como demonstrado no material e métodos (Figura 1). As células tiveram sua expressão gênica avaliadas e com base nos genes expressos foram caracterizadas segundo a referência de células do CMSP utilizando o pacote Azimuth, como apontado na metodologia. A partir do número total de células foi possível separarmos e avaliarmos o perfil de expressão gênica somente dos monócitos, que foram divididos entre monócitos CD14 e CD16 (Figura 1).

3.3 Proporções de monócitos CD14 e CD16 no sangue e no tecido intestinal na doença de Crohn

Além da caracterização dos bancos de dados, após a integração dos dados referentes às subpopulações de monócitos, nós avaliamos por meio do teste de Chi-Quadrado as proporções de células CD14 e CD16 na comparação entre portadores e não portadores da doença. Uma possível diferença entre os grupos pode sugerir ação diferencial destas mesmas células em compartimentos diferentes, como o sangue e o tecido intestinal. A figura 3 demonstra que no sangue, existe uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as proporções dos monócitos CD14 e CD16 nos dois grupos de indivíduos, demonstrando maiores números de CD14 em portadores da doença.

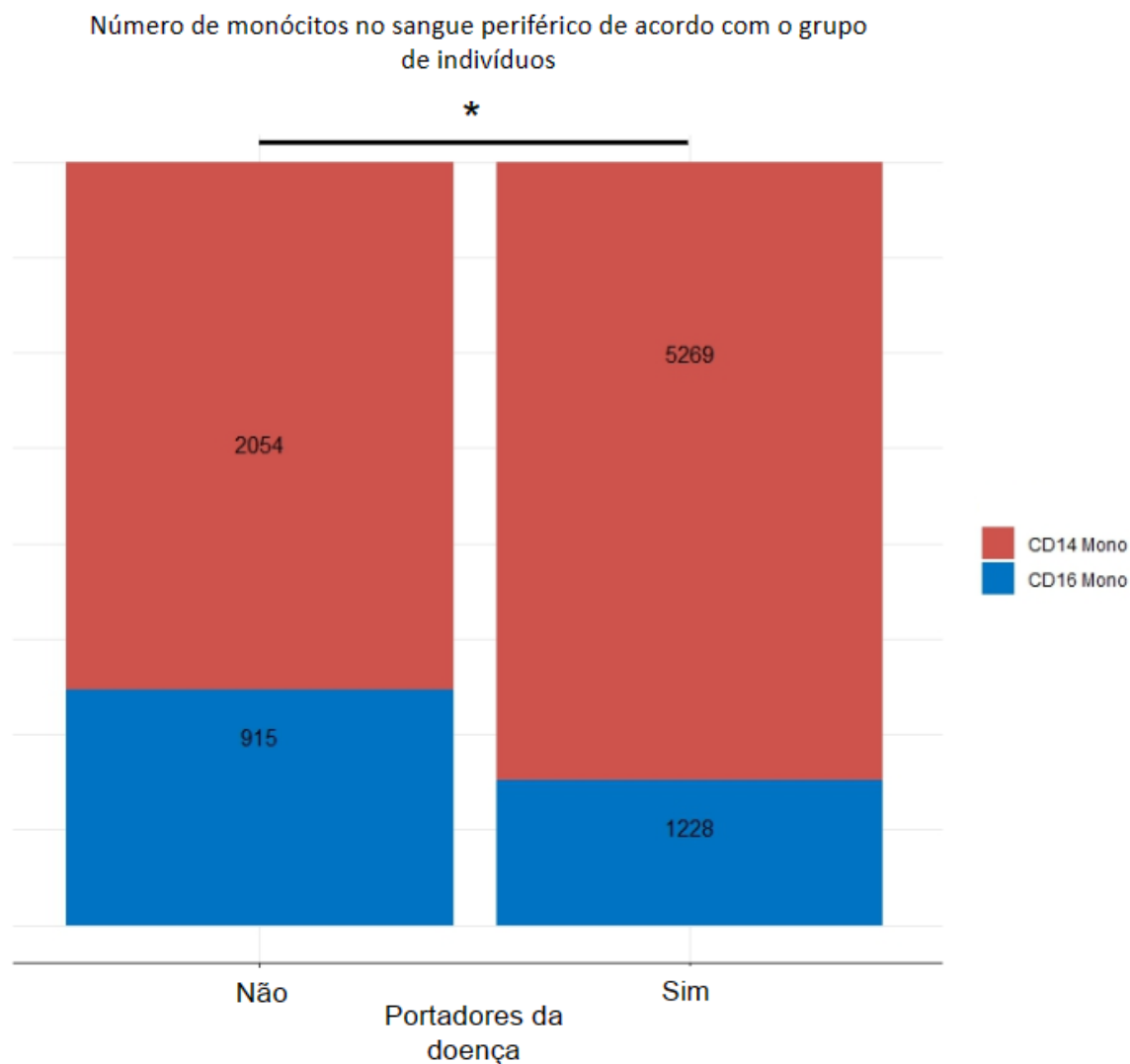


Figura 3. Proporções de células CD14 e CD16 no sangue periférico. Ilustra as proporções de células CD14 e CD16 no sangue periférico de indivíduos portadores e não portadores da doença de Crohn. No eixo 'y' está representado a porcentagem enquanto os números dentro das barras representam o valor absoluto de células CD14 ou CD16 nos indivíduos. Teste de Chi-quadrado rejeitou a H0 ($p < 0,05$), demonstrando que há dependência da proporção de células de acordo com o grupo de indivíduos

Entretanto, essa diferença não foi observada no tecido intestinal (Figura 4). A diferença observada no sangue pode ser devido ao fato de termos uma possível alteração produção de células pelo processo da hematopoese ou recrutamento destas células, tendo isto em mente, esperamos que a análise de DEGs nos forneça melhores indicativos a respeito destas duas subpopulações tanto presentes no sangue quanto no tecido intestinal.

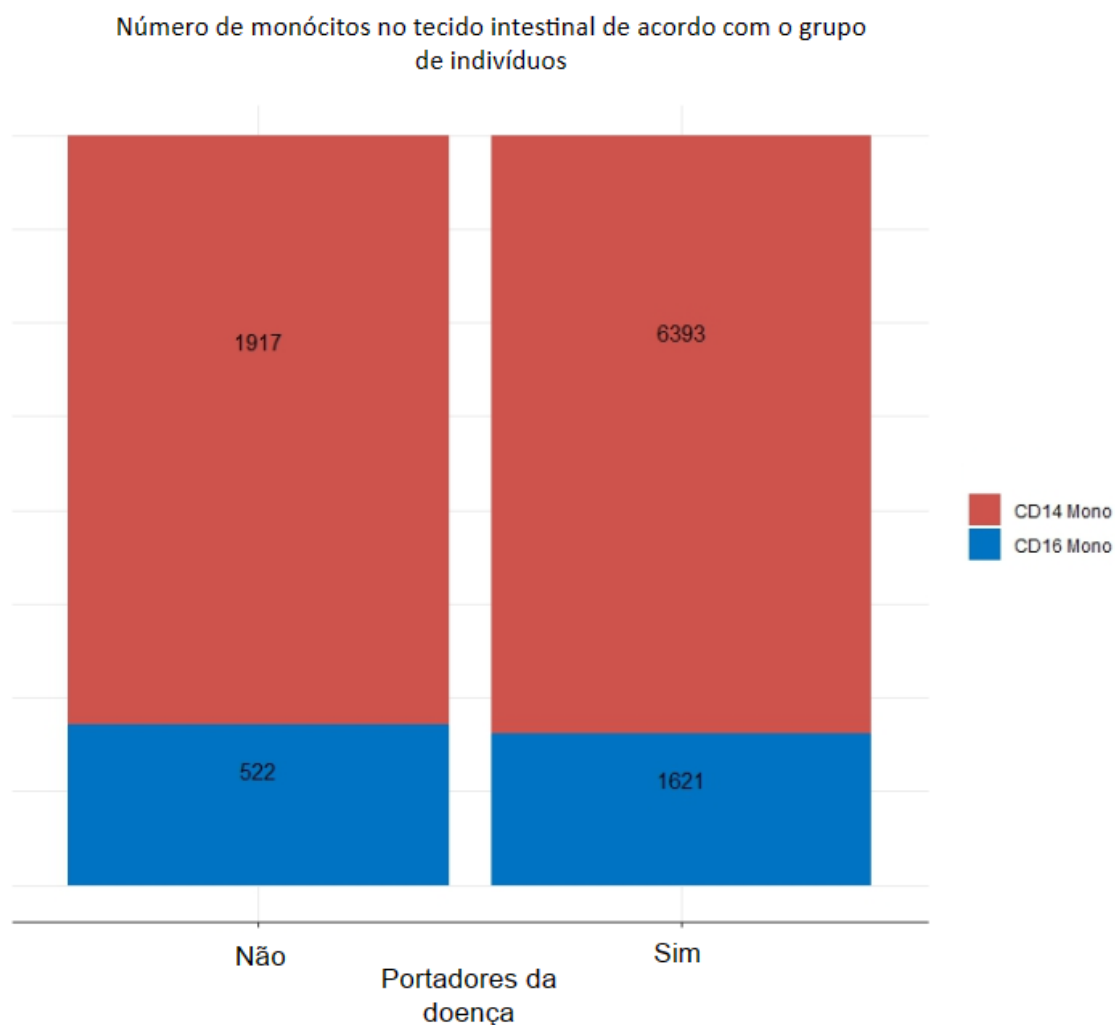


Figura 4. Proporções de células CD14 e CD16 no tecido intestinal. Ilustra as proporções de células CD14 e CD16 no tecido intestinal de indivíduos portadores e não portadores da doença de Crohn. No eixo 'y' está representado a porcentagem enquanto os números dentro das barras representam o valor absoluto de células CD14 ou CD16 nos indivíduos

Após caracterizado as coortes envolvidas nos estudos, a termos avaliado a proporção de células CD14 e CD16 no sangue e no tecido intestinal, partimos para primeiramente analisar a expressão gênica dos monócitos presentes no sangue periférico, e *a posteriori* iremos analisar dos monócitos presentes no tecido intestinal.

3.4 Genes inflamatórios diferencialmente expressos em monócitos CD14 e CD16 circulantes na doença de Crohn

Caracterizar as proporções celulares é importante para que possamos correlacionar com a patologia e como o recrutamento de novas células pode estar ocorrendo. Se tratando do sangue periférico, foi possível observarmos diferenças, mas

não só isso basta para observarmos diferenças no perfil de sinalização inflamatória, portanto prosseguimos para as análises de genes diferencialmente expressos.

A primeira análise feita foi a comparação de DEGs em monócitos CD14 e CD16 circulantes de indivíduos portadores da DCrohn. Os resultados demonstram que os monócitos CD14 de pacientes possuem 79 genes *upregulated* e nenhum gene *downregulated* (valor-p ajustado <0,05) em comparação com os indivíduos não portadores (Figura 5A). Já monócitos CD16 circulantes apresentaram 31 DEGs *upregulated* (valor-p ajustado <0,05) e 10 DEGs *downregulated* (valor-p ajustado <0,05) (Figura 5B). Interessante notar que os monócitos CD16 apresentam alguns poucos genes *downregulated* em doentes na comparação com os indivíduos saudáveis, enquanto o mesmo não foi observado em monócitos CD14, deixando claro uma diferença na atuação destes dois tipos celulares dentro da resposta imune, sendo esta última subpopulação mais correlacionada a sinalização inflamatória.

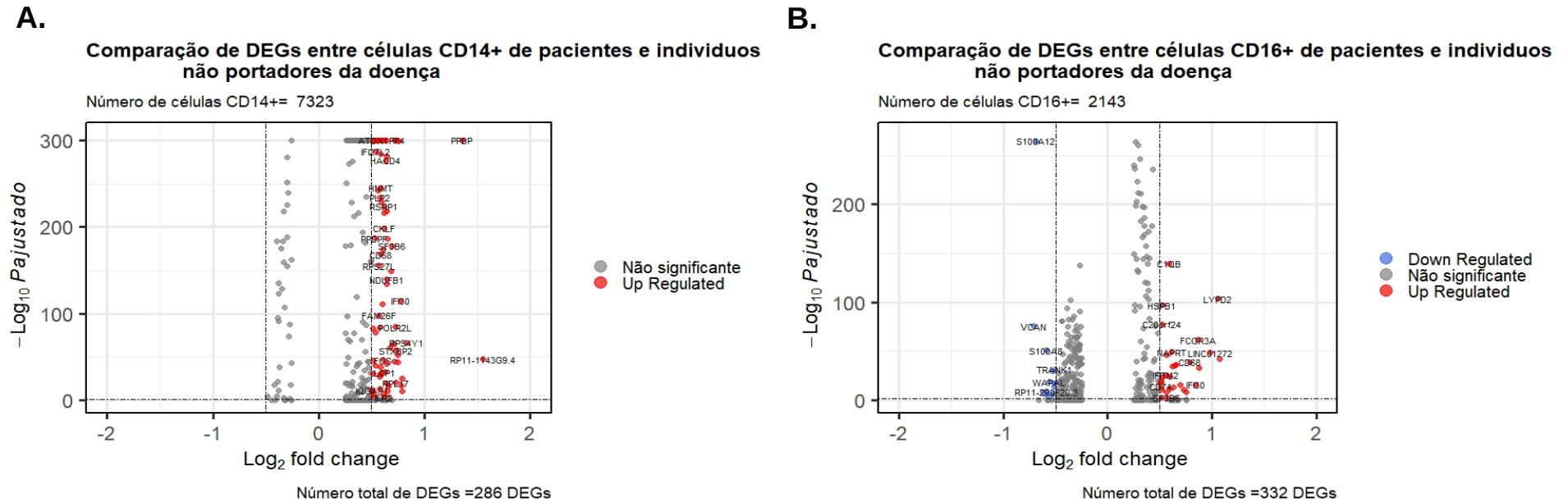


Figura 5. Genes diferencialmente expressos em monócitos CD14+ e CD16+ no sangue periférico. Ilustra os genes diferencialmente expressos encontrados a partir da comparação das células (A) CD14+ do sangue periférico e (B) CD16+ do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Crohn e não portadores. Foram analisadas a expressão de 7323 células CD14+ e de 2143 células CD16+ de ambos os grupos de indivíduos. Utilizando o teste estatístico de Wilcoxon estão marcados em vermelho os genes que apresentaram $p < 0,05$ e valor de $\log_2 \text{fold change} > 0,5$ (*upregulated*), enquanto em azul estão os genes que apresentaram $p < 0,05$ e valor de $\log_2 \text{fold change} < -0,5$ (*downregulated*)

Além de sabermos qual o padrão de genes diferencialmente expressos, é importante sabermos quais são estes genes. Após a análise de DEGs, nós buscamos no banco de dados KEGG quais eram os DEGs que estavam associados com vias da resposta imune inflamatória, visto que a DCrohn se caracteriza por uma inflamação crônica. Nos monócitos circulantes, dos 79 DEGs, 11 (13,9%) eram genes associados a inflamação em monócitos CD14, enquanto dos 31 DEGs, 8 (25,8%) eram genes associados a inflamação em monócitos CD16 (Figura 6). Importante sabermos com quais genes iremos trabalhar, para assim podermos focar em vias celulares e melhor entender a ação destas células na patologia.

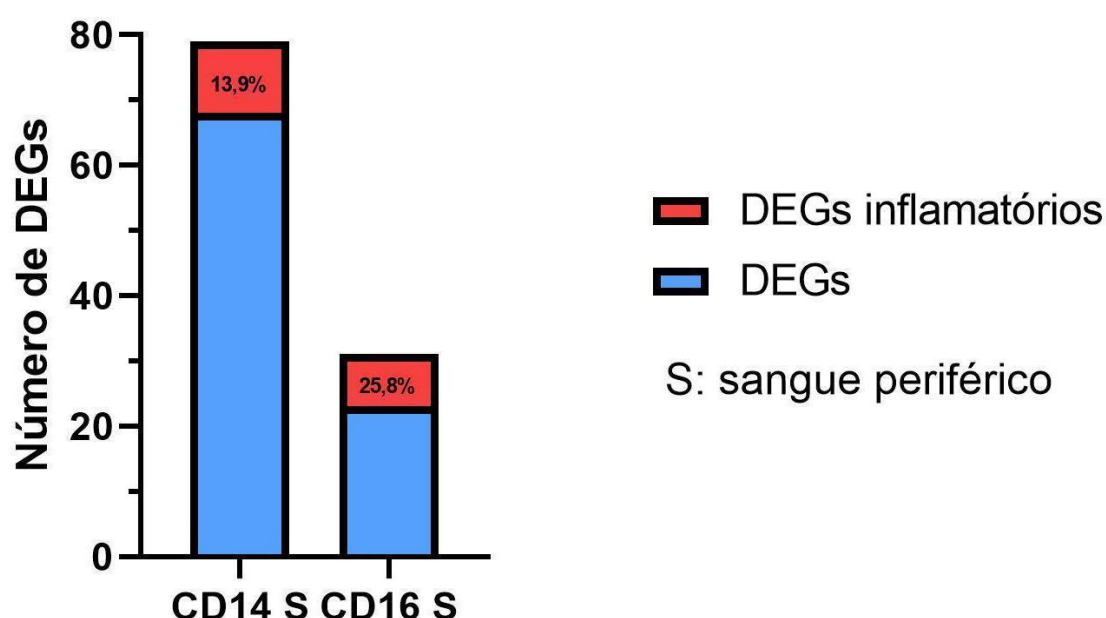


Figura 6. Número de genes inflamatórios em relação aos genes diferencialmente expressos totais no sangue periférico. Em azul o número de genes diferencialmente expressos significativos, ou seja, com $p < 0,05$ e valor de $\log_2 \text{fold change} > 0,5$, enquanto a barra vermelha ilustra o número de genes inflamatórios segundo as vias mapeadas no *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Em monócitos CD14+ do sangue periférico (CD14 S) temos 11 genes inflamatórios (13,9%) de 79 genes diferencialmente expressos significativos, enquanto nos monócitos CD16+ do sangue periférico (CD16 S) temos 8 genes inflamatórios (25,8%) de 31 genes diferencialmente expressos significativos

Sabendo que existem genes associados à resposta inflamatória entre os genes diferencialmente expressos, agora podemos observar sua expressão em cada grupo de pacientes e agrupá-los segundo suas semelhanças.

3.5 Clusterização de genes inflamatórios em monócitos CD14 circulantes e suas vias associadas na doença de Crohn

Após sabermos quais genes estão associados com a resposta imune inflamatória em monócitos circulantes, nós representamos a expressão destes genes em um *heatmap* no qual também podemos ver a expressão segundo o grupo de indivíduos. Além de representados no *heatmap* a expressão dos genes inflamatórios, nos recorremos a clusterização para saber quais genes se agrupam segundo a sua expressão nas células, esta clusterização nos permite melhor avaliar e saber quais vias intracelulares podem estar alteradas visto que genes sozinhos podem estar envolvidos em várias vias, enquanto genes agrupados tendem a serem melhores associados a vias celulares. A clusterização dos genes encontrados em monócitos CD14 evidenciou 3 *clusters*. O primeiro formado pelos genes *CYBB* e *MCL1*, o segundo formado pelos genes *TNFSF13B*, *PF4*, *PPBP*, *CTSB*, *LY96* e *POLR2L*, e o terceiro formado pelos genes *S100A8*, *FOS*, *VCAN* (Figura 7). A partir destes *clusters* nós procuramos a quais vias intracelulares estes conjuntos de genes estão associados, segundo a ferramenta EnrichR, que utiliza bancos de dados manualmente anotados para retornar vias significativamente associadas aos genes de interesse.

Expressão dos DEGs inflamatórios com valor de p ajustado $<0,05$ e $\log_2 FC > 0,5$ na população de células CD14+
 Número total de monócitos CD14+ = 7323

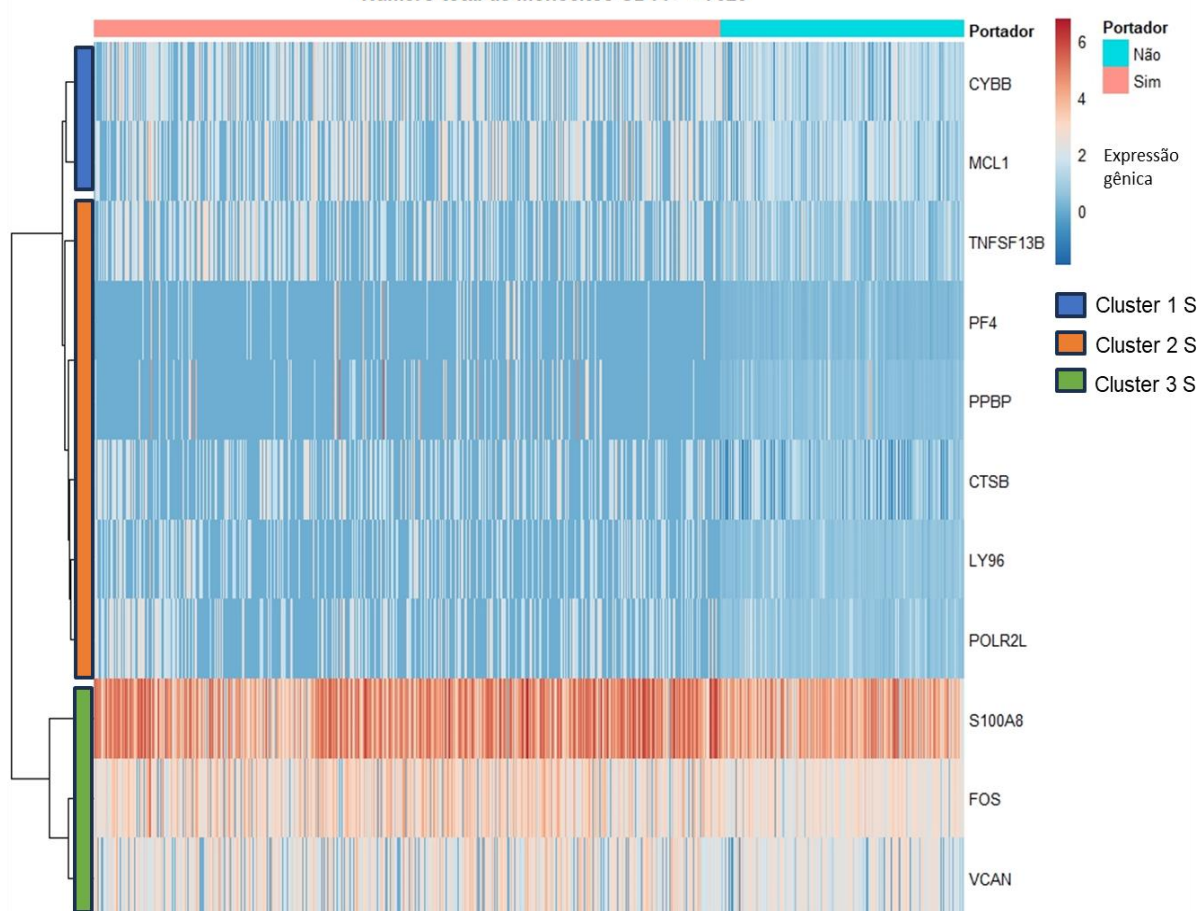


Figura 7. Heatmap da expressão gênica dos 11 genes associados à resposta inflamatória em células CD14+ no sangue periférico. O heatmap ilustra a expressão gênica (valores $\log_2$ normalizados) dos 11 genes inflamatórios encontrados em monócitos CD14+ do sangue periférico. Cada coluna presente no heatmap corresponde a expressão de uma célula analisada no sequenciamento de RNA *single cell*. De cima para baixo, as barras bicolores indicam a qual tipo de paciente a coluna pertence, sendo agrupadas em células de pacientes portadores da doença de Crohn ou não portadores. Da esquerda para a direita, as barras coloridas indicam a qual cluster aquele grupo de células pertence de acordo com o padrão de expressão gênica dos genes escolhidos, descritos na coluna da direita. Para a clusterização com base na expressão gênica foi utilizado o método euclidiano de clusterização completa

Como fora mencionado anteriormente, os genes quando avaliados em grupo permitem melhor entendimento das vias intracelulares envolvidas na doença. Neste próximo passo nós buscamos quais vias estão associadas a cada *cluster* formado no heatmap.

O primeiro *cluster* de células CD14 do sangue periférico está associado a vias de morte celular, como podemos observar na tabela 1. As vias representadas na tabela 1, todas apresentaram valores significativos ($p < 0,05$ e valor- p ajustado $< 0,05$). Portanto este primeiro *cluster* de genes sugere monócitos CD14 circulantes que estão com suas vias de morte celular alteradas.

Tabela 1. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*CYBB* e *MCL1*) do *cluster 1* encontrado em monócitos CD14+ do sangue periférico

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Regulamento negativo de anoikis (GO:2000811)	0,001599	0,006745	MCL1
Via de sinalização apoptótica extrínseca na ausência de ligante (GO:0097192)	0,001599	0,006745	MCL1
Fusão mitocondrial (GO:0008053)	0,001799	0,006745	MCL1
Geração de ânion superóxido (GO:0042554)	0,001899	0,006745	CYBB
Liberação de citocromo C da mitocôndria (GO:0001836)	0,001899	0,006745	MCL1
Regulação da morte celular por anoikis (GO:2000209)	0,002099	0,006745	MCL1
Regulação negativa da via de sinalização apoptótica extrínseca na ausência de ligante (GO:2001240)	0,002199	0,006745	MCL1
Regulação negativa da transdução de sinal na ausência de ligante (GO:1901099)	0,002199	0,006745	MCL1
Alterações mitocondriais de indução a apoptose (GO:0008637)	0,003397	0,007279	MCL1
Via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta a danos no DNA (GO:0008630)	0,004894	0,009788	MCL1

Representação dos nomes das vias, o identificador no *Gene Ontology*, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo $p < 0,05$.

O segundo *cluster* observado nos monócitos CD14 circulantes é formado pelos genes *TNFSF13B*, *PF4*, *PPBP*, *CTSB*, *LY96* e *POLR2L*. Estes genes estão principalmente associados a vias intracelulares de resposta a bactérias, também vias de resposta à sinalização por quimiocinas e espécies reativas do oxigênio relacionadas aos genes do segundo *cluster* (Tabela 2). Adicionando ao primeiro *cluster*, nós observamos que monócitos CD14 circulantes possuem alteração nas vias de morte celular e estão sinalizando uma resposta frente a estímulos bacterianos.

Tabela 2. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*TNFSF13B*, *PF4*, *PPBP*, *CTSB*, *LY96*, *POLR2L*) do *cluster 2* encontrado em monócitos CD14⁺ do sangue periférico

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Detecção de molécula de origem bacteriana (GO:0032490)	0,001499	0,01049	LY96, PPBP, PF4
Regulação positiva da via de sinalização mediada por lipopolissacarídeo (GO:0031666)	0,001799	0,01185	LY96
Transcrição de tRNA por RNA polimerase III (GO:0042797)	0,002098	0,01237	POLR2L
Transcrição de tRNA (GO:0009304)	0,002398	0,01279	POLR2L
Regulação positiva da diferenciação de macrófagos (GO:0045651)	0,002997	0,01526	PF4
Resposta celular à quimiocina (GO:1990869)	1,27e+12	0,002081	PPBP, PF4
Resposta celular à molécula de origem bacteriana (GO:0071219)	0,000003852	0,0002570	LY96, PPBP, PF4
Resposta celular a espécies reativas do oxigênio (GO:1901701)	1,59e+12	0,002081	LY96, PPBP, PF4
Resposta celular ao lipopolissacarídeo (GO:0071222)	0,000004589	0,0002570	LY96, PPBP, PF4
Resposta citotóxica frente a micro-organismos simbioses (GO:0051873)	0,003894	0,01739	PF4

Representação dos nomes das vias, o identificador no *Gene Ontology*, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo p ajustado $< 0,05$.

O terceiro e último *cluster* observado em monócitos circulantes CD14 é composto pelos genes *S100A8*, *FOS* e *VCAN*. Os 3 genes estão associados a vias intracelulares de alterações epigenéticas no DNA, resposta ao estresse e novamente alteração de vias de morte celular (Tabela 3). Portanto, ao fim da análise destes 3 *clusters* foi possível observar os monócitos CD14 circulantes apresentando alterações em vias de morte celular, resposta a bactérias e alteração no perfil epigenético.

Tabela 3. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*S100A8*, *FOS*, *VCAN*) do *cluster* 3 encontrado em monócitos CD14+ do sangue periférico

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Agregação de leucócitos (GO:0070486)	0,001050	0,01905	S100A8
Modificação de peptidil-cisteína (GO:0018198)	0,001349	0,01905	S100A8
Alquilação de DNA (GO:0006305)	0,002248	0,01905	FOS
Metilação do DNA (GO:0006306)	0,002997	0,01905	FOS
Resposta ao íon cádmio (GO:0046686)	0,003147	0,01905	FOS
Resposta celular ao íon cádmio (GO:0071276)	0,003296	0,01905	FOS
Gliogênese (GO:0042063)	0,003596	0,01905	VCAN
Resposta de defesa ao fungo (GO:0050832)	0,004344	0,019046	S100A8
Sinalização integrada de resposta ao estresse (GO:0140467)	0,004344	0,019046	FOS
Regulação positiva da via de sinalização apoptótica intrínseca (GO:2001244)	0,005839	0,021861	S100A8

Representação dos nomes das vias, o identificador no *Gene Ontology*, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo $p \text{ ajustado} < 0,05$.

Com isso podemos observar que monócitos circulantes de indivíduos portadores da DCrohn possuem genes alterados relacionados a morte celular, resposta inflamatória mediante antígenos bacterianos e sinalização por quimiocinas, o que pode sugerir uma correlação entre a inflamação tecidual e a sinalização inflamatória nas células circulantes.

3.6 Identificação de *clusters* de genes inflamatórios em monócitos CD16 circulantes na doença de Crohn

Mudando de monócitos CD14 circulantes para CD16 circulantes, seguimos com a mesma abordagem. O *heatmap* representa a expressão dos genes diferencialmente expressos, associados com a resposta inflamatória nos monócitos CD16 circulantes. Após clusterizados a expressão destes genes, observamos a formação de 3 *clusters* (Figura 8), assim como na população CD14. Neste *heatmap* de monócitos CD16 fica claro a distinção na expressão de *HLA* e *CD74* em relação aos demais genes inflamatórios, apesar da representação no *heatmap* colocar a expressão dos portadores da doença próximo a expressão dos não portadores, vale ressaltar que estes genes são DEGs que apresentaram diferença significativa na comparação entre os dois grupos. Novamente, a partir dos *clusters* encontrados nós buscamos na

ferramenta EnrichR quais as vias estavam associadas aos respectivos genes formadores dos *clusters* em CD16 circulantes.

Expressão dos DEGs inflamatórios com valor de p ajustado $<0,05$ e $\log_2 FC > 0,5$ na população de células CD16+

Número total de monócitos CD16+ = 2143

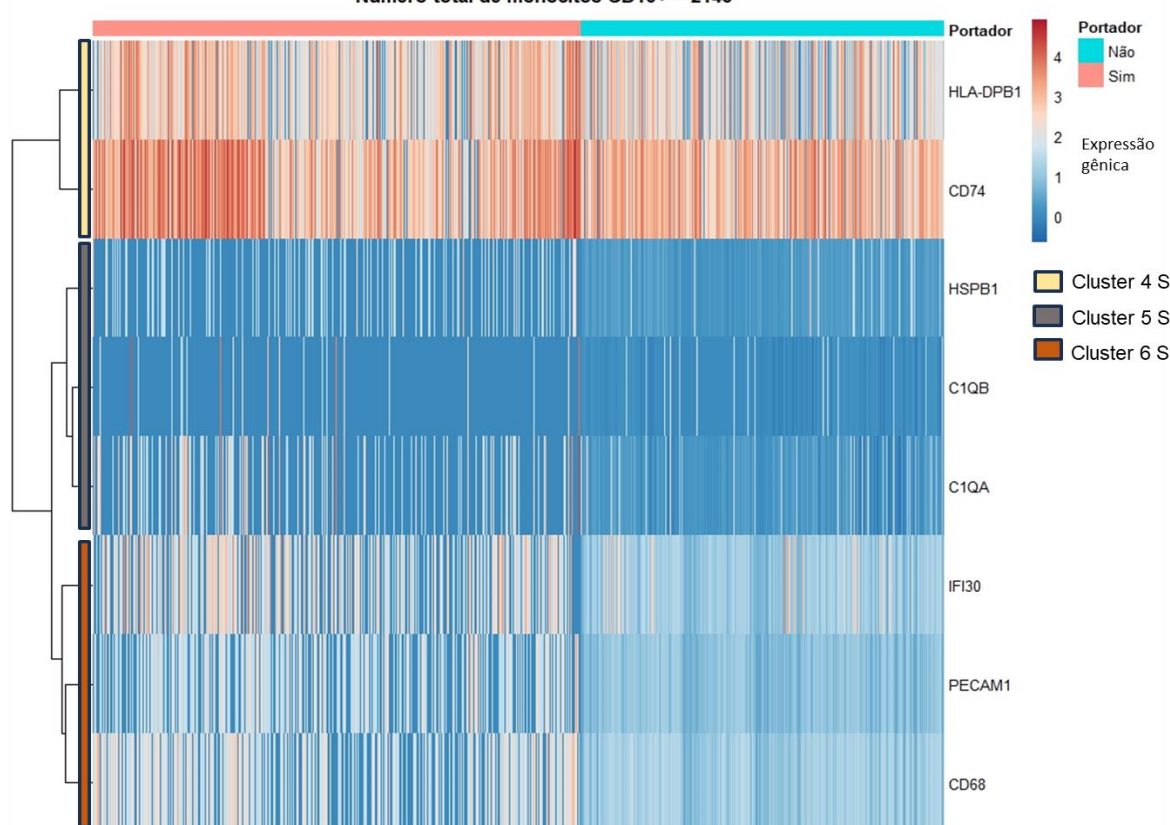


Figura 8. *Heatmap* da expressão gênica dos 8 genes associados à resposta inflamatória em células CD16+ no sangue periférico. O *heatmap* ilustra a expressão gênica (valores $\log_2$ normalizados) dos 8 genes inflamatórios encontrados em monócitos CD14+ do sangue periférico. Cada coluna presente no *heatmap* corresponde a expressão de uma célula analisada no sequenciamento de RNA *single cell*. De cima para baixo, as barras bicolores indicam a qual tipo de paciente a coluna pertence, sendo agrupadas em células de pacientes portadores da doença de Crohn ou não portadores. Da esquerda para a direita, as barras coloridas indicam a qual cluster aquele grupo de células pertence de acordo com o padrão de expressão gênica dos genes escolhidos, descritos na coluna da direita. Para a clusterização com base na expressão gênica foi utilizado o método euclidiano de clusterização completa

O primeiro *cluster* é formado pelos genes *HLA-DPB1* e *CD74*, sua alta expressão chama a atenção no *heatmap*, além de que são genes associados à resposta imune adaptativa, mas também a morte celular dependente de p53 (Tabela 4). Foi possível observar em monócitos CD16 também alteração de vias de morte celular, somando-se assim às alterações já relatadas anteriormente em monócitos CD14.

Tabela 4. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*HLA-DPB1*, *CD74*) do *cluster 4* encontrado em monócitos CD16+ do sangue periférico

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Regulação da resposta imune tipo 2 (GO:0002828)	0,0004999	0,008238	CD74
Regulação do processo biossintético da prostaglandina (GO:0031392)	0,0005999	0,008238	CD74
Regulação positiva do processo biossintético de ácidos graxos insaturados (GO:2001280)	0,0005999	0,008238	CD74
Regulação positiva da diferenciação de monócitos (GO:0045657)	0,0008998	0,008238	CD74
Regulação positiva da entrada por micro-organismo simbiote no hospedeiro (GO:0075294)	0,001200	0,008238	CD74
Regulação positiva da entrada viral na célula hospedeira (GO:0046598)	0,001200	0,008238	CD74
Regulação negativa da via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta ao dano do DNA pelo mediador da classe P53 (GO:1902166)	0,001200	0,008238	CD74
Regulação da via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta a danos no DNA pelo mediador da classe P53 (GO:1902165)	0,001300	0,008238	CD74
Regulação negativa da resposta a danos no DNA, transdução de sinal pelo mediador da classe P53 (GO:0043518)	0,001300	0,008238	CD74
Processo biossintético prostanoide (GO:0046457)	0,001400	0,008238	CD74

Representação dos nomes das vias, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo p ajustado $< 0,05$.

O segundo *cluster* por sua vez é formado pelos genes *HSPB1*, *C1QB* e *C1QA*. Estes genes estão associados a vias que alteram a junção célula-célula, vias de resposta ao EGF e VEGF, e também alterações de morte celular induzida por estresse oxidativo (Tabela 5). Nós observamos alterações na morte celular em ambas as de monócitos circulantes, ademais é interessante notar o aparecimento de vias de sinalização relacionadas ao tecido em monócitos CD16 circulantes, pois são células que possuem a capacidade de migração do sangue para o tecido e novamente para sangue, sugerindo assim uma possível recirculação destas células.

Tabela 5. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*HSPB1*, *C1QB*, *C1QA*) do *cluster* 5 encontrado em monócitos CD16+ do sangue periférico

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Resposta imunológica humoral mediada por imunoglobulina circulante (GO:0002455)	0,0007498	0,009446	C1QB
Afrouxamento da junção da célula-célula (GO:0150146)	0,0007498	0,009446	C1QB
Regulação positiva da migração celular pela via de sinalização do EGF (GO:0038089)	0,001050	0,009446	HSPB1
Regulação positiva da quimiotaxia de células endoteliais (GO:2001028)	0,002099	0,01062	HSPB1
Regulação negativa da via de sinalização intrínseca apoptótica induzida por estresse oxidativo (GO:1902176)	0.002548	0.010622	HSPB1
Regulação da via de sinalização apoptótica intrínseca induzida por estresse oxidativo (GO:1902175)	0.002698	0.010622	HSPB1
Regulação negativa da morte celular induzida por estresse oxidativo (GO:1903202)	0.003446	0.012062	HSPB1
Via de sinalização do receptor do VEGF (GO:0048010)	0.004194	0.013907	HSPB1
Resposta celular ao estímulo do VEGF (GO:0035924)	0.005092	0.013991	HSPB1
Ativação de macrófagos (GO:0042116)	0.005241	0.013991	C1QA

Representação dos nomes das vias, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo p ajustado $< 0,05$.

Encerrando a caracterização dos genes em monócitos circulantes, temos o terceiro *cluster* de monócitos CD16, formado pelos genes *IFI30*, *PECAM* e *CD68*. Novamente vemos genes associados à resposta imune adaptativa, a resposta frente a bactérias (Tabela 6). Monócitos CD16 podem ser associados a função de patrulha do endotélio e tecidos em busca de antígenos, apresentando assim uma função diferencial em relação a subpopulação CD14. Ressaltamos novamente o papel central da resposta às bactérias, além dos monócitos CD14, também observamos aqui em monócitos CD16 genes envolvidos neste perfil de resposta.

Tabela 6. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*IFI30*, *PECAM*, *CD68*) do *cluster 6* encontrado em monócitos CD16+ do sangue periférico

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Processamento do antígeno e apresentação do antígeno peptídico exógeno via MHC de classe I (GO:0042590)	0,0008998	0,01080	IFI30
Regulação do processamento e apresentação de antígenos de células dendríticas (GO:0002604)	0,001200	0,01080	CD68
Resposta celular ao estímulo de partícula de lipoproteína de baixa densidade oxidada (GO:0140052)	0,001349	0,01080	CD68
Processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico via MHC classe I (GO:0002474)	0,002698	0,01238	IFI30
Processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico via MHC de classe II (GO:0002495)	0,004194	0,008705	IFI30
Processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico exógeno (GO:0002478)	0,004642	0,008705	IFI30
Resposta celular ao estímulo de partículas de lipoproteína de baixa densidade (GO:0071404)	0,003296	0,01238	CD68
Processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico exógeno via MHC de classe II (GO:0019886)	0,003895	0,01238	IFI30
Resposta celular à molécula de origem bacteriana (GO:0071219)	0.017448	0.023107	CD68
Resposta celular ao lipopolissacarídeo (GO:0071222)	0.018486	0.023107	CD68

Representação dos nomes das vias, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo p ajustado $< 0,05$.

Assim fechamos as análises de DEGs em monócitos circulantes. Como foi demonstrado monócitos CD16 circulantes, assim como os monócitos CD14, possuem alterações em genes relacionados à morte celular, mas também genes associados à interação com a resposta adaptativa sugerindo assim participação destas células inatas na resposta adaptativa.

3.7 Comparação de genes diferencialmente expressos em monócitos CD14 e CD16 no tecido intestinal na doença de Crohn

Após as análises realizadas nos monócitos circulantes, prosseguimos para as análises em monócitos presentes no tecido intestinal. Essa dupla abordagem é interessante visto a importância da inflamação tecidual na doença, mas também é importante para compreendermos como as células circulantes podem se assemelhar à presentes no tecido afetado.

Seguindo o *pipeline* de análise, comparamos os DEGs em monócitos CD14 e CD16 presentes no tecido intestinal de indivíduos portadores da DCrohn e

indivíduos não portadores da doença. Nossos resultados demonstram que os monócitos CD14 de pacientes possuem 49 genes *upregulated* (valor-p ajustado<0,05) em comparação com os indivíduos não portadores, enquanto não possuem genes *downregulated* (Figura 9A). Por outro lado, ao avaliarmos os DEGs pelos monócitos CD16 circulantes, nós observamos 63 DEGs *upregulated* (valor-p ajustado<0,05) e 7 DEGs *downregulated* (valor-p ajustado<0,05) (Figura 9B). Vale ressaltar aqui que novamente observamos monócitos CD14 com somente genes *upregulated* enquanto monócitos CD16 possuem tanto genes *up* quanto *downregulated*, assim como observado anteriormente nas células presentes no sangue periférico.

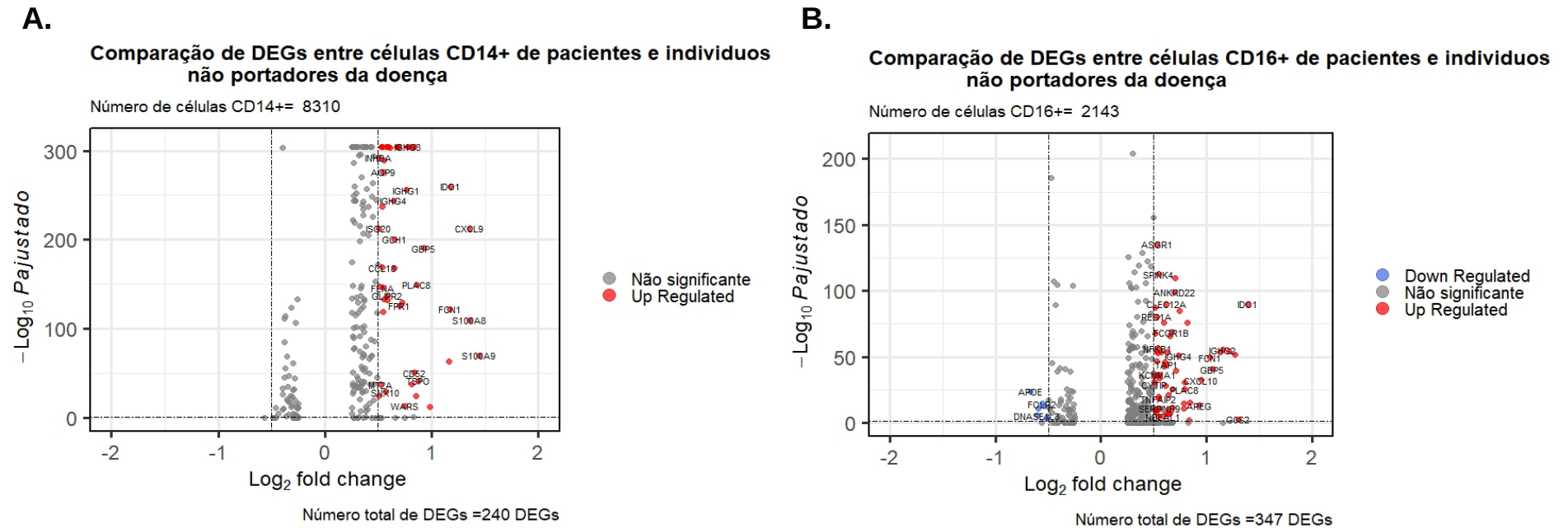


Figura 9. Genes diferencialmente expressos em monócitos CD14+ e CD16+ no tecido intestinal. Ilustra os genes diferencialmente expressos encontrados a partir da comparação das células (A) CD14+ do tecido intestinal e (B) CD16+ do intestinal de indivíduos portadores da doença de Crohn e não portadores. Foram analisadas a expressão de 8310 células CD14+ e de 2143 células CD16+ de ambos os grupos de indivíduos. Utilizando o teste estatístico de Wilcoxon estão marcados em vermelho os genes que apresentaram valor-p ajustado $<0,05$ e valor de $\log_2$ fold change $>0,5$ (*upregulated*), enquanto em azul estão os genes que apresentaram valor-p ajustado $<0,05$ e valor de $\log_2$ fold change $<-0,5$ (*downregulated*)

Após a análise de DEGs, buscamos no banco de dados KEGG quais os genes que estavam diferencialmente expressos nos monócitos CD16 e que eram relacionados às vias da resposta imune inflamatória, mantendo a linha lógica da importância de genes inflamatórios para a DCrohn. Nos monócitos CD14 presentes no tecido intestinal, dos 49 DEGs, 13 (26,5%) eram genes associados à inflamação, enquanto os 63 DEGs, 15 (23,8%) eram genes associados à inflamação em monócitos CD16 (Figura 10). Interessante notar que no tecido os monócitos CD14 possuem menos genes diferencialmente expressos, entretanto são genes mais associados a processos inflamatórios, enquanto CD16 mantém o perfil.

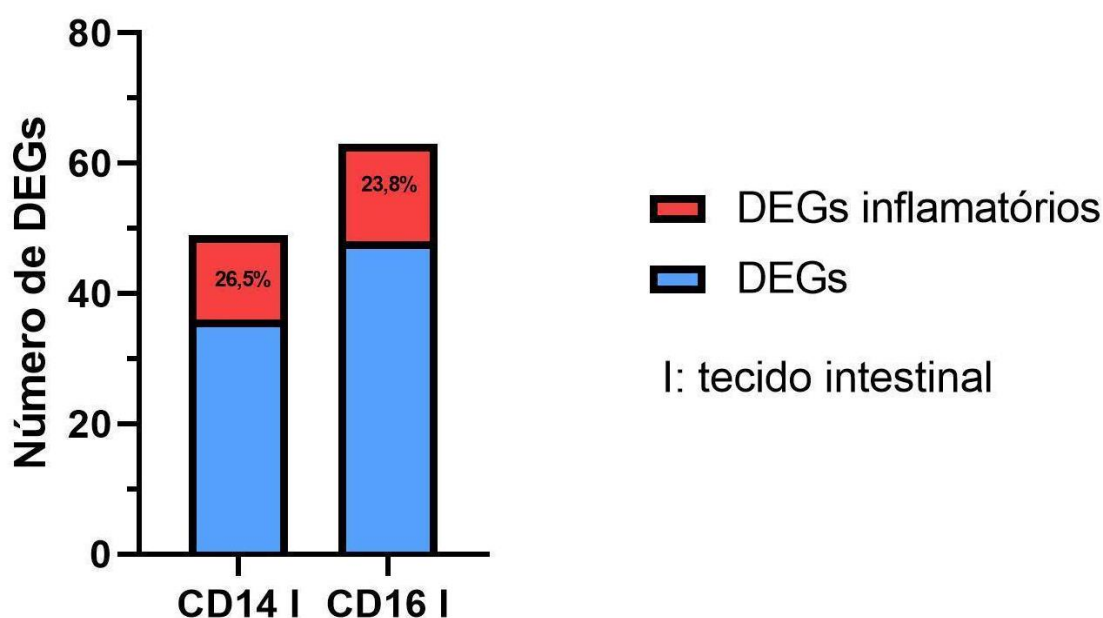


Figura 10. Número de genes inflamatórios em relação aos genes diferencialmente expressos totais no tecido intestinal. Em azul o número de genes diferencialmente expressos significativos, ou seja, com valor-p ajustado $<0,05$ e valor de $\log_2 \text{fold change} >0,5$, enquanto a barra vermelha ilustra o número de genes inflamatórios segundo as vias mapeadas no *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Em monócitos CD14+ do intestino (CD14 I) temos 13 genes inflamatórios (26,5%) de 49 genes diferencialmente expressos significativos, enquanto nos monócitos CD16+ do intestino (CD16 I) temos 15 genes inflamatórios (23,8%) de 63 genes diferencialmente expressos significativos

Novamente, assim como nos monócitos circulantes, foi possível observarmos genes relacionados à resposta inflamatória como sendo DEGs no tecido intestinal de pacientes portadores da DCrohn, ressaltando assim a importância destas células também no tecido afetado pela doença.

3.8 Caracterização de genes envolvidos no recrutamento celular e na inflamação em monócitos CD14 na doença de Crohn

Conhecendo quais genes podem estar envolvidos no processo inflamatório e na resposta imune, nós plotamos a expressão destes genes no *heatmap*, assim como apresentamos os genes de monócitos circulantes. Novamente no *heatmap* além de representado os genes e suas expressões nos dois grupos de indivíduos, nós realizamos a clusterização destes genes para saber quais se agrupam segundo a sua expressão nas células. A clusterização dos genes encontrados em monócitos CD14 evidenciou somente 2 *clusters*. O primeiro formado pelos genes *SERPINA1*, *S100A8* e *S100A9*, e o segundo formado pelos genes *CXCL10*, *EREG*, *CXCL9*, *CCL18*, *INHBA*, *FLNA*, *FGR*, *CXCL11*, *TAP1* e *GBP5* (Figura 11), e a partir destes *clusters* podemos avaliar quais vias intracelulares estão alteradas em decorrência do aumento de expressão dos genes em questão.

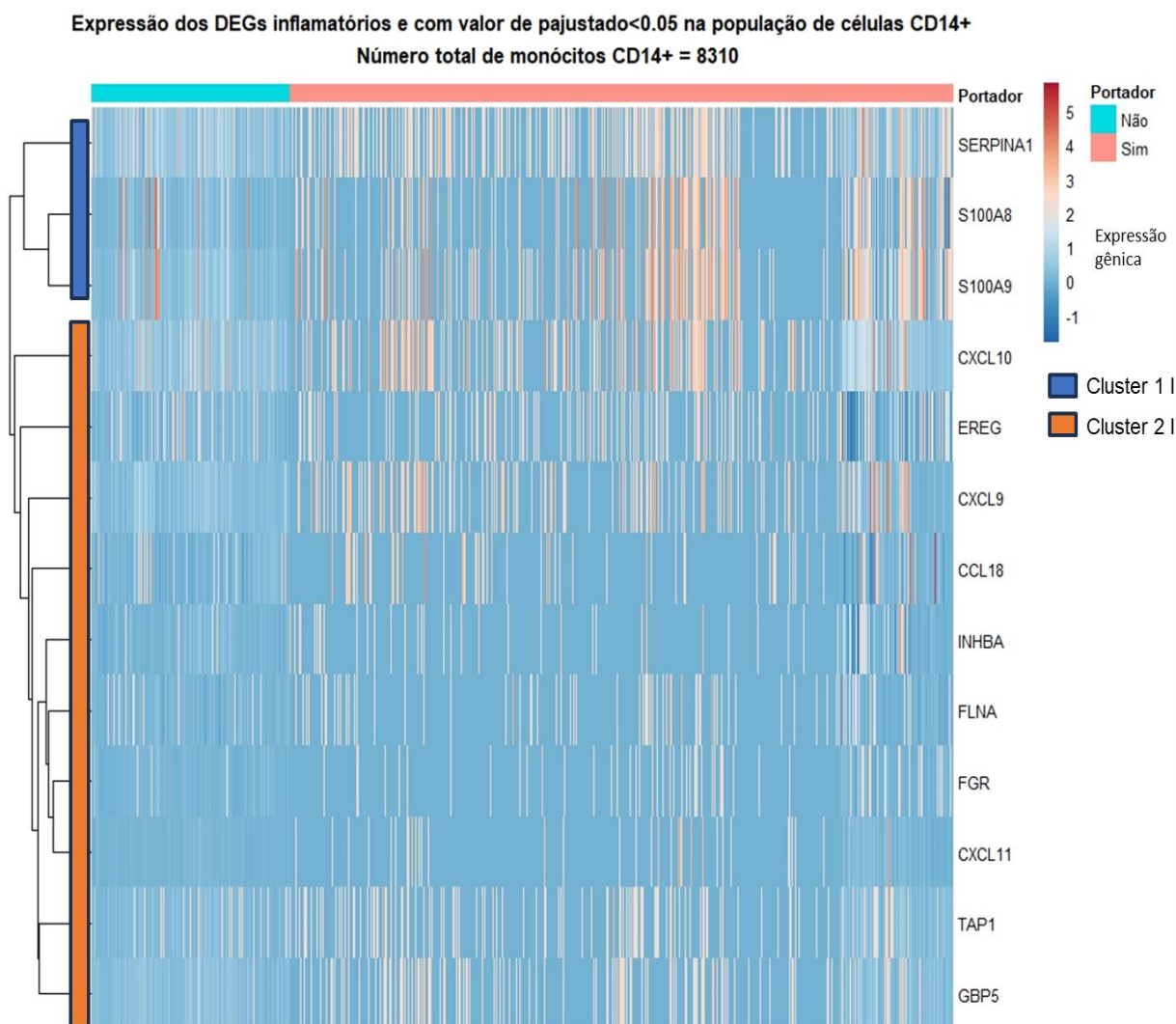


Figura 11. Heatmap da expressão gênica dos 13 genes associados à resposta inflamatória em células CD14+ no tecido intestinal. O heatmap ilustra a expressão gênica (valores log2 normalizados) dos 13 genes inflamatórios encontrados em monócitos CD14+ do tecido intestinal. Cada coluna presente no heatmap corresponde a expressão de uma célula analisada no sequenciamento de RNA *single cell*. De cima para baixo, as barras bicolores indicam a qual tipo de paciente a coluna pertence, sendo agrupadas em células de pacientes portadores da doença de Crohn ou não portadores. Da esquerda para a direita, as barras coloridas indicam a qual *cluster* aquele grupo de células pertence de acordo com o padrão de expressão gênica dos genes escolhidos, descritos na coluna da direita. Para a clusterização com base na expressão gênica foi utilizado o método euclidiano de clusterização completa

O primeiro *cluster* formado segundo a expressão dos genes em monócitos CD14 no tecido intestinal é composto por *SERPINA1*, *S100A8* e *S100A9*. Estes três genes são associados a vias de morte celular, resposta às bactérias e recrutamento de neutrófilos (Tabela 7). Vias de morte celular e resposta às bactérias já foram observadas anteriormente nos monócitos circulantes, entretanto aqui observamos uma diferença, monócitos CD14 no tecido intestinal estão com a expressão aumentada de genes associados ao recrutamento de novas células imunes ao local inflamado, o que

pode sugerir um papel importante dos monócitos no tecido de pacientes portadores da DCrohn.

Tabela 7. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*SERPINA1*, *S100A8*, *S100A9*) do *cluster* 1 encontrado em monócitos CD14+ do tecido intestinal

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Agregação de leucócitos (GO:0070486)	3,149e-7	0,00001188	S100A8, S100A9
Modificação de peptidil-cisteína (GO:0018198)	5,398e-7	0,00001188	S100A8, S100A9
Sinalização autócrina (GO:0035425)	0,0007498	0,001138	S100A8, S100A9
Resposta de defesa ao fungo (GO:0050832)	0,000006084	0,00008924	S100A8, S100A9
Regulação positiva da via de sinalização apoptótica intrínseca (GO:2001244)	0,00001110	0,0001221	S100A8, S100A9
Regulação da via de sinalização apoptótica intrínseca (GO:2001242)	0,00001689	0,0001487	S100A8, S100A9
Regulação positiva da via de sinalização apoptótica (GO:2001235)	0,00002831	0,0001730	S100A8, S100A9
Ativação da atividade da endopeptidase do tipo cisteína envolvida no processo apoptótico (GO:0006919)	0,00003309	0,0001730	S100A8, S100A9
Resposta à molécula de origem bacteriana (GO:0002237)	0,00003511	0,0001730	S100A8, S100A9
Quimiotaxia de neutrófilos (GO:0030593)	3.61e-05	1.73e-04	S100A8, S100A9

Representação dos nomes das vias, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo p ajustado $< 0,05$.

O segundo *cluster* de genes expressos por monócitos CD14 teciduais é constituído por *CXCL10*, *EREG*, *CXCL9*, *CCL18*, *INHBA*, *FLNA*, *FGR*, *CXCL11*, *TAP1* e *GBP5*, sendo um dos maiores *clusters* de genes encontrados no presente trabalho. Estes dez genes, segundo o EnrichR, são associados principalmente a vias de recrutamento de células tanto granulócitos quanto linfócitos (Tabela 8). O aumento da expressão destes genes em monócitos CD14 presente no tecido intestinal pode ser muito relevante para o quadro inflamatório da doença, visto que o maior influxo de células imunes pode levar a piora do quadro clínico e aumento da sinalização inflamatória.

Tabela 8. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*CXCL10*, *EREG*, *CXCL9*, *CCL18*, *INHBA*, *FLNA*, *FGR*, *CXCL11*, *TAP1*, *GBP5*) do *cluster 2* encontrado em monócitos CD14+ do tecido intestinal

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Quimiotaxia de células T (GO:0010818)	0,00001010	0,0002143	CXCL10, CXCL11
Via de sinalização mediada por quimiocina (GO:0070098)	1,229e-8	0,000002101	CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL18
Resposta celular à quimiocina (GO:1990869)	1,415e-8	0,000002101	CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL18
Regulação positiva da liberação de íons de cálcio sequestrados no citosol (GO:0051281)	4,872e-7	0,00002067	CXCL9, CXCL10, CXCL11
Quimiotaxia de neutrófilos (GO:0030593)	2,843e-8	0,000002488	CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL18
Migração de células T (GO:0072678)	0,00003048	0,0004526	CXCL10, CXCL11
Regulação positiva da produção de interleucina-18 (GO:0032741)	0,002498	0,01952	GBP5
Via de sinalização ERBB2-EGFR (GO:0038134)	0,002498	0,01952	EREG
Quimiotaxia de granulócitos (GO:0071621)	3,373e-8	0,000002488	CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL18
Migração de neutrófilos (GO:1990266)	4,189e-8	0,000002488	CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL18

Representação dos nomes das vias, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo p ajustado $< 0,05$.

Apesar de termos observados genes relacionados à morte celular, destaco aqui genes responsáveis pela produção de quimiocinas, mediadores solúveis de grande importância para o recrutamento de novas células imunes para o sítio inflamado. Monócitos CD14 teciduais expressando genes relacionados a quimiocinas sugere sua importância para a formação do infiltrado celular que acomete o tecido intestinal durante o quadro patológico, infiltrado este também grande responsável pelos danos histológicos observados na DCrohn.

3.9 Expressão diferencial de genes inflamatórios em monócitos CD16 teciduais na doença de Crohn

Por fim, seguindo a mesma linha lógica dos monócitos circulantes, representamos a expressão dos 15 genes associados à resposta inflamatória em monócitos CD16 presentes no tecido intestinal (Figura 12), para que possamos associar aos resultados observados em monócitos CD14 teciduais. No *heatmap*, além de representar os genes e suas expressões nos dois grupos de indivíduos, nós

clusterizamos os genes de acordo com sua expressão, possibilitando assim agrupar os genes com expressão assemelhada. A clusterização retornou o resultado demonstrando a presença de 3 *clusters*, o primeiro composto pelos genes *CXCL10* e *CXCL9*; o segundo composto pelos genes *IRF1*, *IL32*, *GBP5*, *TAP1*, *EREG*, *IL1RN*, *CLEC4E*, *NFKB1*, *CCL19* e *CCR7*; e o terceiro e último composto pelos genes *AREG*, *S100A9* e *SERPINA1*. Novamente podemos observar a formação de 3 *clusters* de genes expressos em CD16, demonstrando certa semelhança ao número de *clusters* observados nas células da mesma subpopulação presente no sangue periférico, entretanto os genes e vias envolvidas irão diferir em alguns aspectos.

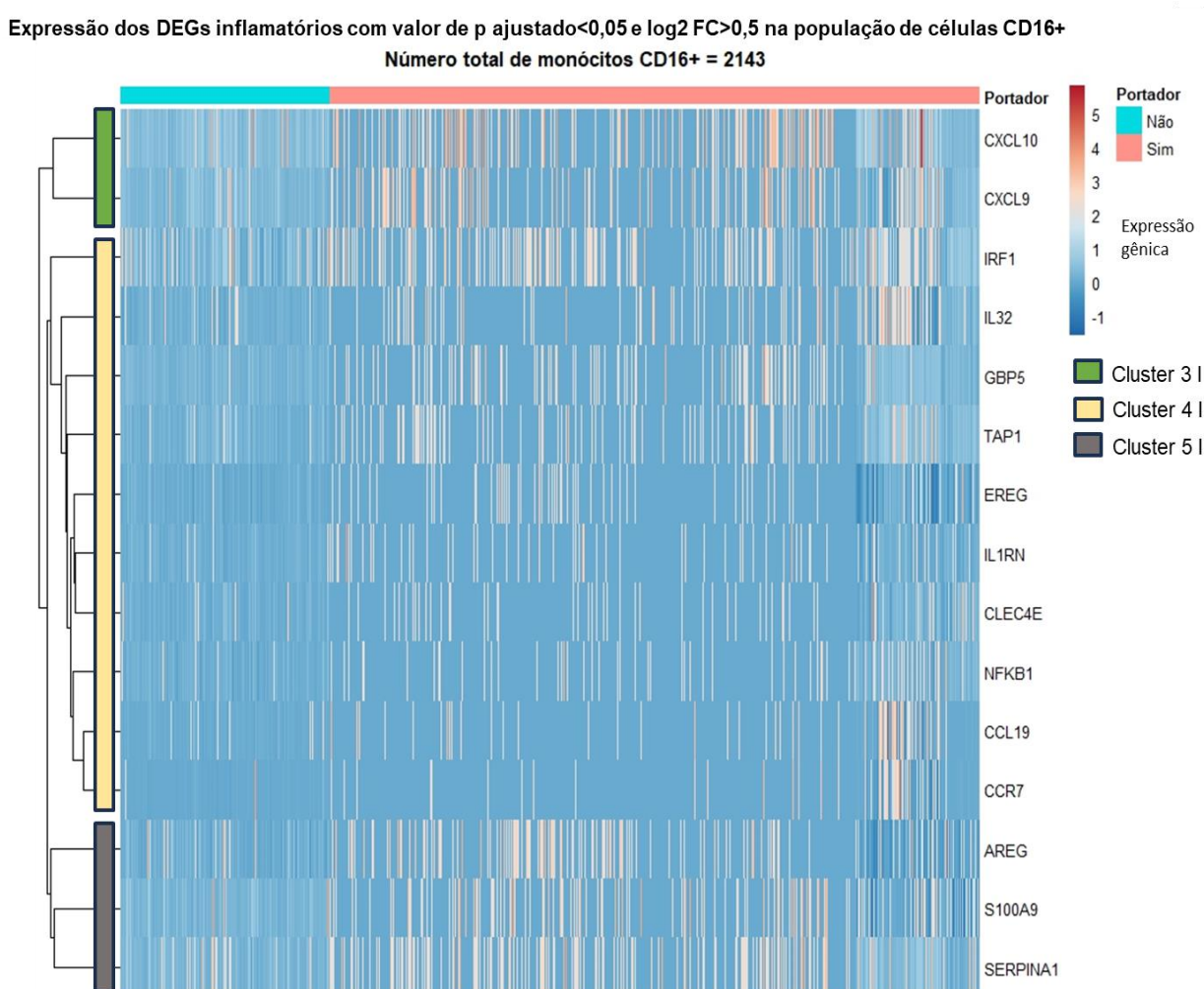


Figura 12. Heatmap da expressão gênica dos 15 genes associados à resposta inflamatória em células CD16+ no tecido intestinal. O heatmap ilustra a expressão gênica (valores log2 normalizados) dos 15 genes inflamatórios encontrados em monócitos CD16+ no tecido intestinal. Cada coluna presente no heatmap corresponde a expressão de uma célula analisada no sequenciamento de RNA *single cell*. De cima para baixo, as barras bicolores indicam a qual tipo de paciente a coluna pertence, sendo agrupadas em células de pacientes portadores da doença de Crohn ou não portadores. Da esquerda para a direita, as barras coloridas indicam a qual cluster aquele grupo de células pertence de acordo com o padrão de expressão gênica dos genes escolhidos, descritos na coluna da direita. Para a clusterização com base na expressão gênica foi utilizado o método euclidiano de clusterização completa

O primeiro *cluster* de genes observado no CD16 tecidual, composto por *CXCL10* e *CXCL9*, está associado à resposta humoral a bactérias e a sinalização mediada por cálcio. Além disso, possui importante relação com o recrutamento de linfócitos efetores e células NK (Tabela 9). Assim como observado nas células CD14 presentes no intestino, as células CD16 também estão envolvidas no recrutamento de novas células imunes ao tecido inflamado, mas vale ressaltar aqui o papel desta subpopulação de monócitos na resposta humoral a bactérias e a sinalização intracelular mediada por cálcio decorrente da ativação da resposta imune nestas células CD16 teciduais.

Tabela 9. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*CXCL10*, *CXCL9*) do *cluster* 3 encontrado em monócitos CD16+ do tecido intestinal

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Regulação positiva da liberação de íons de cálcio sequestrados no citosol (GO:0051281)	0,000002640	0,00007477	CXCL9, CXCL10
Regulação positiva do transporte transmembranar de íons de cálcio (GO:1904427)	0,000004305	0,00007477	CXCL9, CXCL10
Regulação da liberação de íon de cálcio sequestrado no citosol (GO:0051279)	0,000006375	0,00007477	CXCL9, CXCL10
Via de sinalização mediada por quimiocinas (GO:0070098)	0,000007980	0,00007477	CXCL9, CXCL10
Resposta celular à quimiocinas (GO:1990869)	0,000008555	0,00007477	CXCL9, CXCL10
Resposta imune humoral antimicrobiana mediada por peptídeo antimicrobiano (GO:0061844)	0,00001040	0,00007477	CXCL9, CXCL10
Quimiotaxia de neutrófilos (GO:0030593)	0,00001207	0,00007477	CXCL9, CXCL10
Quimiotaxia de granulócitos (GO:0071621)	0,00001314	0,00007477	CXCL9, CXCL10
Migração de neutrófilos (GO:1990266)	0,00001463	0,00007477	CXCL9, CXCL10
Resposta humoral antimicrobiana (GO:0019730)	0,00002475	0,0001138	CXCL9, CXCL10
Representação dos nomes das vias, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo p ajustado $< 0,05$.			

O segundo *cluster*, formado pelos genes *IRF*, *IL-32*, *GBP5*, *TAP1*, *EREG*, *IL1RN*, *CLEC4E*, *NFKB1*, *CCL19* e *CCR7*, está associado a sinalização com células dendríticas e sua capacidade de induzir resposta mediada por linfócitos (Tabela 10). As interações entre monócitos presentes no tecido intestinal e outras células imunes pode ser central para a correta homeostasia do microambiente intestinal. A alteração observada em genes relacionados sugere uma importante participação da subpopulação CD16 na manutenção da resposta imune mediada por células dendríticas.

Tabela 10. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*IRF*, *IL32*, *GBP5*, *TAP1*, *EREG*, *IL1RN*, *CLEC4E*, *NFKB1*, *CCL19*, *CCR7*) do *cluster 4* encontrado em monócitos CD16+ do tecido intestinal

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Regulação negativa do processo apoptótico de células dendríticas (GO:2000669)	0,000003371	0,0002886	CCR7, CCL19
Regulação do processo apoptótico de células dendríticas (GO:2000668)	0,000008085	0,0002991	CCR7, CCL19
Resposta à prostaglandina E (GO:0034695)	0,00001010	0,0003199	CCR7, CCL19
Regulação negativa do processo apoptótico leucocitário (GO:2000107)	0,00001235	0,0003199	CCR7, CCL19
Resposta ao óxido nítrico (GO:0071731)	0,00001235	0,0003199	CCR7, CCL19
Regulação positiva do processo biossintético de glicoproteínas (GO:0010560)	0,00001750	0,0003836	CCR7, CCL19
Estabelecimento da polaridade dos linfócitos (GO:0001767)	0,002498	0,01079	CCR7
Regulação positiva da produção de interleucina-18 (GO:0032741)	0,002498	0,01079	GBP5
Via de sinalização ERBB2-EGFR (GO:0038134)	0,002498	0,01079	EREG
Regulação do processo biossintético do hialuronano (GO:1900125)	0,002498	0,01079	NFKB1

Representação dos nomes das vias, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo p ajustado $< 0,05$.

O último *cluster* observado nos monócitos CD16 teciduais é formado pelos genes *AREG*, *S100A9* e *SERPINA*. Estes genes estão associados a vias importantes da resposta imune como resposta a bactérias e fungos, micro-organismos importantes na microbiota intestinal, mas além destas vias, observamos genes associados à sinalização mediada pelo receptor de EGF (Tabela 11). Observando o conjunto dos genes observados alterados nos monócitos CD16, podemos sugerir uma atuação importante no recrutamento de novas células ao sítio inflamado, sinalização da resposta mediada por linfócitos e a sinalização decorrente do microambiente intestinal inflamado.

Tabela 11. Processos biológicos encontrados na base de dados do *Gene Ontology* associados aos genes (*AREG*, *S100A9*, *SERPINA*) do *cluster* 5 encontrado em monócitos CD16+ do tecido intestinal

Nome da via celular (identificador no <i>Gene Ontology</i>)	Valor-p	Valor-p ajustado	Gene associado
Sinalização autócrina (GO:0035425)	0,0007498	0,01619	S100A9
Agregação de leucócitos (GO:0070486)	0,001050	0,01619	S100A9
Modificação de peptidil-cisteína (GO:0018198)	0,001349	0,01619	S100A9
Regulação positiva da atividade do EGFR (GO:0045741)	0,001499	0,01619	AREG
Regulação positiva da atividade do receptor de sinalização (GO:2000273)	0,005390	0,020352	AREG
Regulação da atividade do EGFR (GO:0007176)	0,003895	0,02018	AREG
Resposta de defesa ao fungo (GO:0050832)	0,004344	0,02018	S100A9
Regulação positiva da atividade da proteína tirosina quinase (GO:0061098)	0,005689	0,020352	AREG
Regulação positiva da via de sinalização apoptótica intrínseca (GO:2001244)	0,005839	0,020352	S100A9
Regulação positiva da via de sinalização do EGFR (GO:0045742)	0,004942	0,020352	AREG

Representação dos nomes das vias, o valor-p e o valor-p ajustado. Valor-p foi calculado utilizando o teste exato de Fisher, e considerado como significativo $p < 0,05$. Valor-p ajustado foi calculado utilizando a correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas hipóteses, e considerado como significativo p ajustado $< 0,05$.

Vale notar a importante expressão de genes de quimiocinas, relacionados ao recrutamento de novas células imunes para o tecido. Assim como os monócitos CD14, os genes observados diferencialmente expressos em CD16 teciduais sugerem importante participação no recrutamento de células imunes para o local inflamado, ressaltando o papel importante de monócitos como um *hub* de produção de quimiocinas que irão atrair mais células imunes para o tecido intestinal afetado.

3.10 Análise de *single cell RNA sequencing* revela genes específicos e comuns de monócitos CD14 e CD16 na doença de Crohn

O presente trabalho compreende uma ampla gama de análises de scRNA-seq, com diferentes genes e vias celulares associadas. Portanto, como fechamento dos dados apresentados anteriormente compilamos os genes que foram avaliados e apresentados nos *heatmaps* e tabelas. Na figura 13 estão representados na esquerda os genes específicos a células CD14 ou CD16 circulantes. Os monócitos CD14 expressam exclusivamente os genes *CYBB*, *LY96*, *POL2R*, *MCL1*, *PF4*, *FOS*, *TNFSF13B*, *PPBP*, *VCAN* e *CTSB*, e para os monócitos CD16 são os genes *CD68*, *IFI30*, *HSPB1*, *PECAM1*, *CD74*, *HLA-DPB1*, *C1QA* e *C1QB*. Na coluna da direita estão os genes específicos a CD14 ou CD16 presentes no tecido intestinal, sendo os genes

INHBA, *FLNA*, *CXCL11*, *CCL18*, *GBP5*, *FGR* e *TAP1* específicos de monócitos CD14 teciduais; e os genes *AREG*, *IRF1*, *NFKB1*, *IL1RN*, *IL32*, *CELC4E*, *CCL19* e *CCR7* estão presentes somente em monócitos CD16 teciduais. Na porção central da figura estão os genes que apareceram em mais de um tipo celular e/ou em mais de um tecido avaliado, compreendendo assim genes comuns, são estes os genes *EREG*, *TAP1*, *S100A9*, *S100A8*, *SERPINA1*, *CXCL9*, *CXCL10* e *GBP5*; representando assim genes comuns às subpopulações de monócitos independente do tecido avaliado. Na figura podemos observar maior gama de genes específicos a cada tipo celular de cada tecido avaliado, entretanto os oito genes comuns demonstram que existem semelhanças importantes entre os monócitos CD14 e CD16 tanto teciduais quanto presentes no sangue periférico.

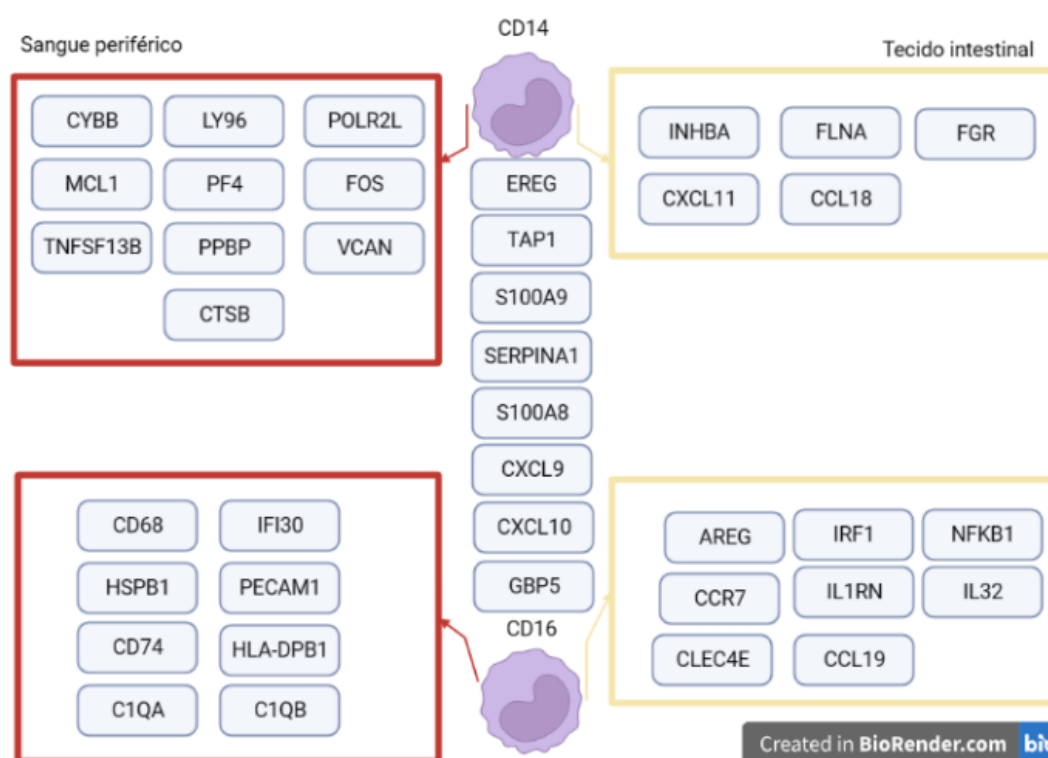


Figura 13. Genes inflamatórios expressos em cada tipo celular e tecido analisado. Estão representados na figura os genes inflamatórios que tiveram as vias celulares avaliadas ao longo dos resultados e discussão. Da esquerda para direita temos os genes sendo expressos no sangue periférico por células CD14 ou por células CD16, no meio estão os genes que são comuns as populações de monócitos em ambos os tecidos avaliados, e na direita temos representados os genes sendo expressos no tecido intestinal por células CD14 ou CD16

Os resultados de bancos de dados de scRNA-seq compostos com indivíduos portadores e não portadores da DCrohn demonstra aspectos importantes da ação dos monócitos na doença, sugerindo sua participação no recrutamento de outras

células imunes ao sítio inflamado, além de sinalizar para a resposta imune adaptativa presente no tecido intestinal. Ademais, as células circulantes demonstram um perfil semelhante às células teciduais nos aspectos inflamatórios e de alteração nas vias de morte celular.

4 DISCUSSÃO

Atualmente, com o advento das ferramentas de proteômica, metabolômica e transcriptômica, e melhoria de análises de bioinformática, o uso de banco de dados públicos se apresenta como uma importante metodologia para avançar no conhecimento de certas patologias. Primeiro foi desenvolvido o sequenciamento total de RNA mensageiro, metodologia essa que utilizava o tecido como um todo, sem qualquer tipo de separação dos diferentes tipos celulares, recebendo assim o nome de *bulk* RNA-seq. Apesar da metodologia de *bulk* RNA-seq gerar grande quantidade de dados, ela possui um viés quando falamos de populações celulares. Por não possuir diferenciação das células, ou seja, não podemos diferenciar uma célula da outra durante o sequenciamento e assim perdemos especificidade quanto o perfil de expressão gênica. Em tecidos multivariados, como o caso de tumores sólidos ou sítios de inflamação, a ampla gama de tipos celulares expressando diferentes genes pode levar a conclusões dúbias acerca do padrão de expressão, por isso o uso da técnica de scRNA-seq é recomendada.⁽¹⁰¹⁾ Dessa forma os resultados, tendo em vista também o que foi colocado pela banca de qualificação, aqui compilados apresentam os dados referentes a análises de banco de dados provenientes de estudos que utilizaram a técnica de *single cell* RNA-seq.

Após as análises de expressão do banco de dados IBD TaMMA, seguindo a sugestão da banca de qualificação, partimos para as análises de scRNA-seq de bancos de dados públicos para melhor entender as populações celulares e buscar marcadores da doença. O objetivo do scRNA-seq é contornar este viés imposto pelo *bulk* RNA-seq e possibilitar que identifiquemos cada célula durante o sequenciamento, permitindo assim durante as análises, que possamos precisamente saber quais populações celulares estão expressando determinados genes.⁽⁹²⁾

Tendo este panorama em mente, buscamos no presente trabalho fazer uso destas tecnologias e avaliamos a expressão gênica e vias intracelulares associadas de monócitos CD14 e CD16, circulantes e teciduais. Uma vez que a DCrohn é uma doença complexa, envolvendo diversos tipos celulares, uma análise sem amplitude poderia deixar passar aspectos importantes das relações intercelulares e entre tecidos. Inicialmente optamos por esta abordagem devido a sua característica única em fornecer dados específicos acerca das populações celulares, em especial, de monócitos,

fornecendo assim qualidade e quantidade para avaliarmos as funções das células imunes no quadro patológico de DCrohn, que cada vez mais se mostra uma doença complexa.

Após caracterizada a coorte do banco de dados, podemos ver que compreende uma amostra de 30 homens e 17 mulheres, com médias de idade que variam de 14 a 45 anos, sendo assim um conjunto de amostras que compreende várias faixas etárias. Segundo Wang et al., a DCrohn acomete indivíduos desde a segunda infância até os 90 anos. Em seu artigo, os autores demonstraram que a DCrohn, apesar da baixa prevalência, pode acometer crianças com 5 anos de idade ou mais velhas, enquanto adultos por volta dos 60 anos de idade representam o grupo mais acometido pela doença. Apesar de não haver diferença significativa entre homens e mulheres acometidos pela doença quando estratificados pela faixa etária, os autores do artigo evidenciaram que no período avaliado, de 1990 à 2019, as mulheres tiveram maior representatividade nos diagnósticos realizados.⁽⁷⁾ A ampla gama de indivíduos que utilizamos para as análises realizadas é interessante visto que assim podemos observar o perfil de expressão gênica na doença em uma diversidade maior de pacientes e não somente em um grupo específico, o que pode enviesar os achados e assim limitar sua aplicabilidade futura. Além da caracterização etária e de gênero, nós também caracterizamos o número de células que foram utilizadas nas análises. Apesar do número total de células ser importante, aqui iremos focar somente em monócitos e suas duas subpopulações, a CD14 e CD16. Nossos dados demonstraram diferença significativa entre os dois grupos de indivíduos quanto ao número de monócitos CD14 e CD16 circulantes, entretanto no tecido não observamos tal diferença estatística. Anderson et al. avaliaram a contagem sanguínea de monócitos em pacientes portadores da DCrohn e a relacionaram com o *status* clínico da doença. Os autores demonstraram que pacientes com aumento do número de monócitos circulantes estavam mais propensos a piora do quadro clínico em comparação a aqueles que não apresentaram tal aumento, estabelecendo assim a contagem de monócitos como um biomarcador de severidade da DCrohn.⁽¹⁰²⁾ Por outro lado, Kondo et al. demonstraram que monócitos estão com a frequência de células aumentadas no tecido inflamado de pacientes portadores da DCrohn, deixando claro a importância dos monócitos na doença. Além destes dados, os autores também observaram que a abundância de monócitos no tecido estava relacionada a períodos de piora do quadro da doença, em contrapartida quadros mais brandos e os controles apresentaram abundância baixa destas células no tecido

intestinal.⁽¹⁰³⁾ Os dados de Anderson et al. e Kondo et al. se complementam dando importância dos monócitos no quadro patológico, entretanto, como foi apresentado anteriormente nossos dados somente demonstram aumento significativo dos monócitos circulantes, enquanto no tecido os números se mantêm semelhantes. Tal achado pode sugerir que a infiltração de monócitos no tecido não está alterada, enquanto monócitos circulantes podem estar com seus números alterados decorrentes de uma possível alteração na hematopoese decorrente de uma sinalização inflamatória da DCrohn.

Dado a importância que as células imunes, especialmente monócitos, parecem ter na patologia, nós analisamos a expressão gênica em dois diferentes tecidos a fim de obtermos um panorama geral da patologia. No presente trabalho dentro da ampla variedade de células imunes existentes, nos focamos em somente um tipo que apesar de sua importância para a resposta inicial frente a estímulos inflamatórios, pouco se sabe sobre seu envolvimento na patologia.

No presente trabalho focamos somente em monócitos, realizando análises mais restritas a somente um tipo celular, entretanto observamos uma gama de genes aumentados e diferencialmente expressos em monócitos CD14 e CD16 no tecido intestinal e também no sangue periférico, ressaltando que os monócitos CD14 possuem somente genes *upregulated* enquanto os monócitos CD16 possuem alguns genes *downregulated* somados ao *upregulated*, sugerindo assim papel central destas células no processo inflamatório intestinal. A importância dos monócitos vem aumentando nos últimos anos. Friedrich et al., avaliaram a expressão gênica de amostras de tecido intestinal de 374 indivíduos portadores da DCrohn. As análises realizadas por estes autores evidenciaram a correlação de 38 grupos de genes com tipo celulares presentes nos tecidos amostrados. Entretanto, dos 38 grupos, 28 tiveram correlações significativas com parâmetros clínicos das doenças intestinais, entre eles inflamação histológica e tipo celulares, como linfócitos e células de origem mieloide, envolvidos na inflamação local. Os autores demonstram assim, com os dados apresentados, que o *status* inflamatório pode estar associado a diferentes tipos celulares presentes e a sinalização inflamatória nos sítios de lesão.⁽¹⁰⁴⁾ Vale ressaltar que Friedrich et al. tinham acesso a outros dados como idade, tempo de diagnóstico e local da biópsia tecidual, podendo assim fazer correlações entre estes dados e a expressão gênica, entretanto no presente trabalho nós não tivemos acesso a estes dados portanto não foi possível realizar tais análises de correlação para que pudéssemos também discutir com os achados já publicados. Apesar destas limitações de análises complementares, foi possível evidenciar o perfil de

expressão gênica de monócitos CD14 e CD16, sugerido assim aspectos moleculares importantes acerca de como estas duas subpopulações podem estar envolvidas no quadro da DCrohn.

Considerando a importância do sistema imune, como colocada por Friedrich et al., mas também a importância dos monócitos apresentada nos dados de Kondo et al., nós avaliamos a expressão gênica de monócitos em pacientes e indivíduos não acometidos pela doença, e observamos algumas alterações no grupo de DEGS entre estes dois grupos de indivíduos. Nossas análises demonstram uma ampla gama de genes diferencialmente expressos, assim como já relatado na literatura. No tecido nós observamos *EREG*, *TAP1*, *S100A9*, *S100A8*, *SERPINA*, *CXCL9*, *CXCL10*, *GBP5*, *INHBA*, *FLNA*, *FGR*, *CXCL11*, *CCL18*, *AREG*, *IRF1*, *NFKB1*, *CCR7*, *IL1RN*, *IL-32*, *CLEC4E* e *CCL19* como DEGs nos indivíduos portadores quando comparados aos não portadores. Nossos achados estão conforme dados da literatura, pertinentes a células presentes no tecido inflamado de pacientes portadores da DCrohn. Dai et al., avaliaram a expressão gênica de células de tecido intestinal provenientes de portadores da DCrohn, buscando um perfil de expressão que possibilitasse melhor entender a doença e a resposta ao tratamento. Os autores encontraram monócitos presentes no tecido inflamado dos pacientes portadores da DCrohn, e estas células apresentaram expressão aumentada de *CD74*, *AREG* e *C1QA*.⁽¹⁰⁵⁾ No presente trabalho nós observamos estes mesmos DEGs em monócitos circulantes e teciduais dos pacientes portadores da DCrohn em comparação aos indivíduos não portadores da doença. Estes genes são importantes para a resposta adaptativa, sinalização intracelular e cascata do complemento, respectivamente, dessa forma sugerindo uma importância dos monócitos na inflamação tecidual e também na sinalização inflamatória na corrente sanguínea, fato este que pode resultar com maior recrutamento de células para o sítio inflamado e manifestação de sintomas extra-intestinais, como já é relatado em pacientes portadores da DCrohn.⁽⁴³⁾

Nós observamos monócitos circulantes expressando *S100A8*, *EREG*, *HLA-DPB1*, *C1QA* e *HSPB1*, genes relacionados ao processo inflamatório, a resposta adaptativa, e a cascata do complemento, sugerindo assim o envolvimento de várias vias da resposta imune. Devlin et al. avaliaram monócitos provenientes de pacientes portadores de colite ulcerativa, outra importante DII. Os autores relataram o aumento de células monocíticas no íleo de pacientes portadores desta doença, caracterizando-as como monócitos com alta expressão de *IL-1 β* e *LYZ*. Estas células expressavam também

HLA-DPB1 e *C1QA*, e se relacionam negativamente com a resposta a terapia com biológicos que possuem como alvo a integrina $\alpha 4\beta 7$, o aumento do número de células $IL-1\beta^+/LYZ^+$ leva a menor resposta frente ao tratamento, demonstrando assim papel importante destes monócitos na cronicidade da doença e na sinalização inflamatória. Além disso, na comparação com o tecido saudável, o tecido proveniente de pacientes portadores de colite ulcerativa apresentou aumento na expressão de *S100A8*, *EREG*, *CXCL2* e *IL-8*. Mais adiante, os autores estenderam sua análise a outro banco de dados, desta vez formado por amostras de pacientes portadores da DCrohn. Suas análises neste novo banco de dados, identificaram esta mesma população $IL-1\beta^+/LYZ^+$ demonstrando semelhanças entre os dois tipos de DIIs.⁽¹⁰⁶⁾ Os genes observados no presente trabalho estão de acordo com os dados previamente publicados por Devlin et al., ademais demonstra algumas semelhanças importantes entre duas importantes DIIs, a DCrohn e a colite ulcerativa. Essa semelhança entre as duas doenças, fornece dados importantes para entendimento das DII. Infelizmente não pudemos correlacionar os tipos celulares com a resposta ao tratamento, visto que não temos os dados relativos ao tratamento utilizado por todos os indivíduos, no entanto, devemos ressaltar esta observação feita por Devlin, por ser essencial para formar melhor arcabouço teórico acerca da doença e assim delinear novos alvos terapêuticos que possam ser utilizados. Ainda sobre o artigo de Devlin, além das semelhanças entre as doenças, os autores demonstram que os monócitos $IL-1\beta^+/LYZ^+$ se correlacionam positivamente com outras células presentes no SGI, os monócitos $IL-1\beta^+/LYZ^+$ se correlacionam com células endoteliais por meio da expressão de genes como *HSPB1*, enquanto apresentam forte conexão com células Th17, conexão esta que os autores ainda não conseguiram descrever por completo.⁽¹⁰⁶⁾ Interessante notar que observamos monócitos CD16 circulantes expressando *HSPB1* em pacientes, demonstrando assim a relação desta subpopulação de células com o endotélio e sugerindo que células CD16 circulantes possam estar migrando do sangue para o tecido e vice versa. Já no tecido nós observamos monócitos CD14 e CD16 expressando *CXCL9*, *CXCL10*, *CCR7* e *GBP5*, todos genes associados a quimiotaxia de linfócitos e a indução de polaridade em linfócitos, sugerindo assim que a conexão observada por Devlin et al. entre monócitos e linfócitos Th17 possa estar sendo mediada pelos genes aqui observados.

Os achados apresentados no presente trabalho, relativos à expressão diferencial de genes do sistema complemento, *C1QA* e *C1QB*, além de *VCAN* e *S100A9*, em monócitos circulantes estão de acordo com dados prévios da literatura. Chapuy et al.

se utilizou da metodologia de scRNA-seq observou monócitos aumentados no tecido de pacientes portadores da DCrohn. Além de correlacionar estas células com o *score* endoscópico de severidade da doença, os autores também observaram aumento da expressão de citocinas inflamatórias, *TNF- α* , *IL-23*, *IL-1 β* e *IL-6*, por estas células, juntamente com um grupo de monócitos tendo a expressão de *C1QA* e *C1QB* aumentadas,⁽⁶²⁾ relacionando assim a expressão de citocinas inflamatórias com os genes do sistema complemento. Em nossos achados, apesar de não termos observado estes genes no tecido, nós observamos aumento da expressão de outras citocinas e quimiocinas no tecido, enquanto os genes do sistema complemento estavam alterados em monócitos circulantes, sugerindo assim que a sinalização inflamatória pode ser observada nas células circulantes. Genes diferencialmente expressos no sangue, relacionados à doença, podem ser avaliados futuramente como biomarcadores da doença, ressaltando a importância de avaliarmos células teciduais e circulantes. Já referente aos achados dos genes *VCAN* e *S100A9* no presente trabalho, Chapuy et al. publicaram uma revisão acerca do uso de tecnologias *single cell* e células mononucleares em pacientes portadores da DCrohn que discutia a expressão destes genes no quadro patológico. Em seu texto os autores ressaltam a importância do uso destas tecnologias para melhor entender o microambiente intestinal e as relações entre células imunes e não imunes na patologia. Ademais, eles elencam genes de interesse importantes para a inflamação observado no tecido dos pacientes portadores, sendo eles os genes *S100A9*, *C1QA*, *C1QB* e *VCAN*. Por fim, também ressaltam a importância da plasticidade dos monócitos circulantes, colocando-os como importantes precursores de novas células infiltrantes no tecido inflamado.⁽¹⁰⁷⁾ Novamente, os dados do presente trabalho estão de acordo com artigos já publicados, sugerindo assim uma importante função dos monócitos no desenvolvimento da resposta inflamatória, visto que apresentam a expressão aumentada de genes tidos como centrais na DCrohn.

Nós identificamos *S100A8* e *S100A9* como um gene diferencialmente expresso, aumentado tanto na população CD14 quanto CD16 no tecido dos pacientes portadores da DCrohn. Além disso, também observamos aumentado o *NFKB1* em monócitos CD16 teciduais, sugerindo assim um perfil pró-inflamatório destas células presentes no tecido intestinal. Recentemente, Kong et al. publicaram um artigo trazendo mais dados sobre a atuação inflamatória dos monócitos na DCrohn. Os autores demonstraram a presença de uma população de monócitos caracterizada pela expressão de *S100A8* e *S100A9*, genes responsáveis pela calprotectina utilizada como

marcador da DCrohn. Além destes dois genes, a população de monócitos apresentou aumento de *NFKB1*, um fator de transcrição importante para a resposta inflamatória das células do sistema imune inato e também adaptativo.⁽¹⁰⁸⁾ Nós identificamos os mesmos genes nas populações CD14 e CD16 presentes no tecido dos pacientes portadores da DCrohn, se correlacionando assim diretamente aos resultados de Kong. Entretanto vale ressaltar que os autores não especificaram qual subpopulação de monócitos seus resultados se correlacionam, no presente trabalho nós conseguimos diferenciar entre duas subpopulações de monócitos adicionando assim mais especificidade aos resultados já existentes na literatura, e sugerindo a importância de ambas as populações para a sinalização inflamatória na DCrohn, não estando somente restrita a população CD14, já reconhecida como inflamatória dentro dos monócitos.

O perfil de DEGs pode variar entre os estudos publicados, entretanto como venho apresentando aqui, existe uma similaridade entre os dados da literatura e os achados do presente trabalho, fato este que sugere genes comuns como importantes para o entendimento da patologia e também como futuros alvos terapêuticos. No presente trabalho, nós observamos *C1QA*, *C1QB*, *IL1RN*, *IL32*, *S100A8* e *S100A9* diferencialmente expressos em monócitos provenientes de pacientes portadores da DCrohn. Os genes *C1QA* e *C1QB* estão sendo expressos em monócitos CD16 circulantes, já o *IL1RN* e *IL32* estão sendo expressos por CD16 teciduais, juntamente com outras quimiocinas da família CCL e CXCL. O *S100A8* e *S100A9* pode ser observado aumentado tanto em CD14 circulantes quanto em CD14 e CD16 presentes no tecido intestinal inflamado. Martin et al. observaram o aumento de células mononucleares em tecido inflamado de pacientes portadores de DCrohn em comparação ao tecido não inflamado destes mesmos pacientes. Nas análises de scRNA-seq, os autores evidenciaram a expressão aumentada dos genes *C1QA*, *C1QB*, *IL1RN*, *S100A8*, *S100A9*, *CXCL8* e *IL32* nas células mononucleares, mais especificamente, monócitos e macrófagos. Os autores ainda associam estes genes, quando expressos em macrófagos teciduais, como associados à inflamação local observada no tecido afetado.⁽¹⁰⁹⁾ Novamente podemos observar que os achados aqui apresentados são respaldados pela literatura pertinente, entretanto fomos além dos autores, pois foi possível observamos que as subpopulações de monócitos estavam expressando estes genes, e em qual tecido, elencando assim uma característica do tecido mas também um traço diferencial dos monócitos CD14, sugerindo um perfil inflamatório destas células. Novamente podemos ver similaridades entre os dados já publicados e os apresentados no presente

trabalho, sugerindo assim que existe um perfil de expressão semelhante entre os dois tecidos, sangue e intestino, que deve ser considerado para futuros trabalhos.

Avaliar células circulantes e células teciduais de pacientes portadores da DCrohn é importante para avançar no entendimento da doença, como temos tentado demonstrar ao longo do presente estudo. Nesta linha de raciocínio, nós observamos monócitos no sangue e no tecido intestinal expressando genes relacionados ao processo inflamatório como *S100A8*, *S100A9*, *IL1RN*, *TNFSF13B*, e quimiocinas relacionadas ao recrutamento celular como *CCL18*, *CCL19*, *CXCL9* e *CXCL10*. Mitsialis et al. tentaram traçar um paralelo entre células no tecido e células circulantes em pacientes portadores da DCrohn, utilizando também o protocolo de scRNA-seq. Os autores observaram que monócitos circulantes expressavam *S100A8* e *S100A9*, citocinas inflamatórias como *IFNG*, *IL1B*, *IL21*, *IL22*, *IL17A*, e receptores de quimiocinas como *CCR4*, *CCR6*, *CCR7* e *CXCR3*. Ademais, quando avaliado no tecido, monócitos demonstraram estar aumentados em relação com controle, e expressando *IL-1 β* , assim como observado no sangue. Essas alterações para o perfil inflamatório da resposta imune se correlacionam com o período ativo da doença, como demonstrado pelos autores. Eles ainda sugerem que *IL-1 β* seja novo alvo terapêutico, visto que foi exclusivamente observado em pacientes portadores da DCrohn.⁽¹¹⁰⁾ Importante também ressaltar o papel das quimiocinas *CXCL9* e *CXCL10* para recrutar linfócitos efetores e células NK, possuindo assim papel importante na ativação da resposta imune.⁽¹¹¹⁾ Autores demonstraram, em pacientes portadores de câncer, a importância destas quimiocinas para recrutar linfócitos e células NK para o sítio tumoral inflamado evitando assim o crescimento tumoral e favorecendo a resposta antitumoral efetiva.⁽¹¹²⁾ Novamente, Martin et al., utilizando amostras provenientes de portadores da DCrohn, também demonstraram que células mononucleares presentes no tecido inflamado possuíam alta expressão de *CXCL9* e *CXCL10*, expressão esta que se correlacionava com a expressão de *CXCR3* em células T efectoras, Tregs e linfócitos T citotóxicos.⁽¹⁰⁹⁾ As semelhanças do perfil de genes sendo diferencialmente expressos no sangue e no tecido intestinal, novamente sugere a importância dos monócitos no quadro inflamatório da doença e a relação de células circulantes com células teciduais no quadro da DCrohn. Também ressalto aqui a importância de avaliarmos as subpopulações celulares em específico, visto que nossos dados sugerem algumas especificidades em cada uma das subpopulações CD14 e CD16 de monócitos.

Apesar de genes como o *C1QA*, *C1QB*, *S100A8* e *S100A9* estarem

presentes em diversos artigos publicados e no presente trabalho, é necessário fazermos uma ressalva. Elmentaite et al. observaram *C1QA* em células mieloides de fetos e indivíduos pediátricos, colocando este gene como atuante no desenvolvimento do SGI durante o período intrauterino e nos primeiros anos de vida.⁽¹¹³⁾ Eles caracterizaram as células como células mieloides de forma geral, entretanto nós conseguimos observar especificamente em monócitos CD16 teciduais, sugerindo assim que os dados de Elmentaite et al. podem ser provenientes de monócitos CD16 presentes durante o desenvolvimento do SGI. Fawkner-Corbett et al., por sua vez, demonstraram que monócitos do tecido intestinal de crianças possuem níveis aumentados de *S100A9*, e *VCAN*, enquanto os genes *C1QA* e *C1QB* possuem expressão diminuída. Os autores concluem assim que tais genes fazem parte do desenvolvimento do SGI, sendo necessários em níveis diferentes para a correta homeostasia durante os primeiros anos de vida e formação.⁽¹¹⁴⁾ Nossos dados demonstraram aumento de expressão de *S100A9* e *VCAN* em monócitos teciduais e circulantes, além do aumento de *C1QA* e *C1QB* somente nos monócitos circulantes. Podemos ver que a baixa expressão de *C1Q* nos monócitos parece fazer parte do desenvolvimento do intestino, entretanto a mudança do padrão de expressão pode ser um sinal importante que podemos associar a DCrohn, como apresentado até o presente momento. Já o *S100A9* por estar aumentado tanto durante o desenvolvimento quanto em pacientes pode sugerir uma expressão basal no SGI que pode não ser assim relevante como marcador da doença, mas como marcador de homeostasia, visto que alterações dos níveis detectáveis de calprotectina podem ocorrer no microambiente intestinal em outros cenários inflamatórios que não somente a DCrohn.⁽¹¹⁵⁾ Estes dados de desenvolvimento do SGI podem não estar correlacionados diretamente a DCrohn, entretanto são importantes para que possamos filtrar os resultados encontrados em coortes acometidas pela doença e também estabelecer novos alvos de estudos.

No presente trabalho nós demonstramos o aumento da expressão de genes de quimiorreceptores em monócitos CD14 e CD16 teciduais, ressaltando que estas células podem estar sendo recrutadas para o tecido, e ainda podem ser de grande importância para o recrutamento de outras células visto nossos resultados também acerca da expressão de quimiocinas. Pretendendo elucidar novos alvos terapêuticos e também melhor compreender a infiltração de células imunes no tecido inflamado, Verstockt et al. observaram alterações específicas na expressão gênica de pacientes portadores da DCrohn. Utilizando um *pool* de indivíduos portadores de colite ulcerativa

e controles, para comparação, os autores identificaram 11 possíveis novos alvos terapêuticos que deveriam ser avaliados em futuros estudos, destes, ressaltou um, o CXCR4. Este quimiorreceptor é importante para a migração de células imunes para o tecido intestinal inflamado, especialmente linfócitos T, demonstrando assim a importância da sinalização inflamatória dentro do quadro patológico.⁽⁹¹⁾ Os achados de Verstockt et al., juntamente com os apresentados neste trabalho, sugerem o papel importante destas células mieloides sendo recrutadas para o tecido, que por sua vez podem recrutar novas células pela produção de secreção de quimiocinas associadas aos genes que também observamos, colocando monócitos como um possível *hub* de produção de quimiocinas e mediadores solúveis.

Discutido anteriormente, o recrutamento de novas células imunes para o sítio inflamado é importante para a cronicidade da doença, e monócitos parecem ser centrais para esse tipo de sinalização. No presente trabalho, além de genes de quimiocinas importantes, nós observamos genes alterados relacionados à resposta adaptativa como é o caso da *CCL19*, relacionado especificamente a sinalização a linfócitos. Sobre linfócitos, Rosati et al. avançaram neste campo. Os autores identificaram que existem linfócitos com TCRs exclusivos de pacientes portadores da DCrohn. Ainda complementam seus achados demonstrando que os linfócitos presentes no tecido intestinal possuem um padrão de expressão inflamatório, os linfócitos T estão com a expressão aumentada de *CD62L*, molécula de superfície responsável pela adesão destas células ao endotélio, sendo uma das responsáveis pela migração da corrente sanguínea para o tecido inflamado. Além do *CD62L*, os linfócitos CD4 foram observados com alta expressão de *CCR7* e *IL7R*, estas duas moléculas observadas podem ser centrais para o recrutamento celular. A IL-7 é amplamente produzida por células do epitélio intestinal e possui função de ativação da resposta imune. Já a *CCR7* possui como agonista o *CCL19*, outra importante quimiocina para a resposta inflamatória.⁽¹¹⁶⁾ Nossos dados sugerem que monócitos teciduais estão fazendo a ponte entre resposta inata e adaptativa ao produzir *CCL19* importante para o recrutamento de linfócitos CD4 que sejam *CCR7*⁺, desta forma afetando negativamente a resolução da inflamação intestinal observada na DCrohn. Yokoi et al. adicionaram mais dados ao envolvimento de linfócitos T na DCrohn. Os autores demonstraram que pacientes portadores de DCrohn apresentam linfócitos T CD4 de memória efetora aumentados quando comparados a outra doença inflamatória crônica, a colite ulcerativa, sendo assim um aspecto diferencial entre as duas doenças. Além disso os autores do estudo demonstraram que estes

linfócitos T são mais responsivos ao estímulo com citocinas inflamatórias, apresentando uma produção de IL-2 e IFN γ significativamente aumentadas, o que pode indicar também propensão a expansão clonal e cronicidade do quadro patológico.⁽¹¹⁷⁾ Nossos achados demonstraram DEGs relacionados ao estímulo de células T em pacientes portadores da DCrohn. Este achado sugere a participação dos monócitos na resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T, como demonstrado por Yokoi et al., e seu consequente papel neste perfil de expansão clonal e cronicidade da doença decorrente do perfil ativado de células T. A já conhecida participação de linfócitos T na DCrohn se adiciona ao possível envolvimento de monócitos na inflamação e recrutamento de células, não só isso, mas os genes observados alterados no presente trabalho nos sugerem uma ação conjunta e necessária de monócitos e outras células imunes para a cronicidade da doença, portanto ter como alvo somente um tipo celular pode não ser suficiente para o correto tratamento da DCrohn.

Em nossos dados foi possível observar o aumento da expressão de *INHBA*, *AREG*, *S100A8*, *S100A9*, *TNFSF13B* e *GBP5* em monócitos CD14 e CD16 teciduais. Garrido-Trigo et al. observou monócitos inflamatórios presentes no tecido juntamente com macrófagos M1, DCs, neutrófilos e células mieloides em transição no tecido intestinal inflamado de pacientes portadores da DCrohn. Os autores também evidenciaram que macrófagos M1 possuem expressão aumentada de *INHB* e *AREG*, enquanto neutrófilos possuíam expressão diferenciada de *S100A8*, *S100A9*, *TNFSF13B* e *GBP5*.⁽¹¹⁸⁾ Apesar dos autores não terem abordado especificamente monócitos, podemos sugerir uma correlação entre macrófagos, neutrófilos e monócitos presentes no tecido inflamado de pacientes portadores da DCrohn, visto a semelhante expressão de genes entre estes diferentes tipos celulares, ressaltando o caráter interdependente de monócitos e outras células imunes inflamatórias.

Não somente linfócitos e macrófagos podem estar sendo recrutados e ativados juntamente com os monócitos, outras células como as células inatas do sistema imune (ILCs) podem ser relevantes no quadro patológico. As ILCs são células imunes residentes no intestino humano. Essas células são capazes de produzir citocinas, importantes na defesa contra patógenos, na manutenção da homeostase da mucosa e na interação com a microbiota intestinal.⁽¹¹⁹⁾ Parikh et al., se utilizando da metodologia de scRNA-seq, avaliaram o perfil de expressão de células presentes no intestino inflamado de pacientes portadores de DCrohn. Eles dividiram as populações celulares em 10 tipos diferentes, entre elas as ILCs. Os autores observaram ILCs expressando

níveis elevados de *HLA-DPB1* e *CD74* nos pacientes.⁽¹²⁰⁾ Interessante notar que no presente estudo observamos a expressão de *HLA-DPB1* e *CD74* alteradas em monócitos CD16 circulantes. A presença destes dois genes em dois tecidos diferentes e tipos celulares diferentes pode sugerir uma assinatura da doença, assinatura esta que pode ser futuramente avaliada como biomarcador. A elucidação de novos biomarcadores é de grande interesse para o meio científico, visto que o avanço neste campo pode resultar em novas formas de melhor prever a doença ou novos alvos terapêuticos.

As ILCs podem ainda ser relacionadas a outros processos dentro do quadro patológico. Zhou et al. observaram a diminuição de ILCs no tecido inflamado de pacientes portadores de DIIs. Essa diminuição afeta negativamente a homeostasia do tecido, pois as ILCs são capazes de produzir HB-EGF, molécula protetora contra danos induzidos pela sinalização inflamatória de TNF- α .⁽¹²¹⁾

Apesar dos avanços de tecnologias como o scRNA-seq, existem limitações na utilização de coortes humanas. Essas limitações podem ser vencidas utilizando-se de animais de experimentação e linhagens celulares, sendo o primeiro uma abordagem para o desenvolvimento da doença e o segundo uma ótima forma de estudar mecanismos intracelulares. No presente trabalho observamos alterações em vias da morte celular, alterações essas que podem afetar a permanência de células inflamatórias no tecido inflamado ou em circulação, alterando negativamente a resolução da inflamação patológica. Hanna et al. buscando entender a relação de células T e microbiota no desenvolvimento da doença, utilizou camundongos induzidos a desenvolver inflamação intestinal. Os autores demonstraram em seus resultados a importância da permanência e sobrevivência de células Treg ROR γ^+ , permanência essa associada a ausência de morte celular.⁽¹²²⁾ Trabalhando já com linhagens celulares, Rana et al. evidenciaram papel importante de GSDM e outros genes na cicatrização epitelial. Os autores utilizando a linhagem HT-29 demonstram que a GSDM subunidade B estava com sua expressão aumentada após dano epitelial ter sido induzido, se mostrando assim importante para o processo de cicatrização, enquanto linhagens *knockout* para este gene tinha a cicatrização negativamente alterada. Entretanto, não somente GSDMB estava alterado, mas também o EGFR, demonstrando assim uma ativação de outros genes para a correta cicatrização do epitélio.⁽¹²³⁾ No presente trabalho observamos o gene *AREG* aumentado em monócitos CD16 teciduais, este gene pode ser relacionado a via de sinalização iniciada por EGFR, sugerindo uma ação não somente em células epiteliais, mas também em células imunes do EGF. Avaliar vias de

morte celular, como apoptose e piroptose, pode ser interessante como próximos passos, visto sua importância segundo estudos de animais experimentais e modelos de linhagens celulares. Shao et al. em sua revisão sobre piroptose, elenca a morte celular como fundamental para a resposta frente a bactérias e alterações observadas em DIIs, principalmente com relação a alteração da expressão da GSDM.⁽¹²⁴⁾ Booty et al. em sua revisão adicionam ainda importantes ações da GSDM em quadros patológicos. Durante quadros de infecção bacteriana, produtos bacterianos como o LPS podem levar à polimerização de 6 subunidades de GSDM, culminando na formação de um poro na membrana. Este poro irá levar a morte celular, com consequente liberação de conteúdo intracelular, com destaca a IL-1 β e IL18, citocinas inflamatórias que irão induzir o recrutamento de células imunes ao local e consequente processo inflamatório.⁽¹²⁵⁾ Conhecido a importância do desbalanço da microbiota intestinal nos pacientes portadores de DCrohn e a ação da piroptose, estudos futuros focados nesta via de morte se fazem necessários para melhor entender a relação entre a microbiota, o epitélio e as células imunes presentes no local.

Por fim, o presente estudo não avança sobre quais vias intracelulares possuem maior importância para a inflamação intestinal induzida por monócitos, visto que não realizamos ensaios utilizando linhagens celulares ou animais modelos. A fim de avançar no conhecimento acerca da doença, os próximos passos lógicos seriam estabelecer a importância dos genes apresentados e vias associadas e testá-las em modelos *in vitro* ou *in vivo*. Spalinger et al. deixam claro a necessidade deste próximo passo para elucidar aspectos desconhecidos da doença. Os autores se utilizando de linhagens celulares de epitélio e macrófagos, demonstraram que a comunicação entre epitélio e células imunes é de suma importância, visto que o *knockdown* de PTPN2 levou a indução de perfil inflamatório nos macrófagos, elucidando assim uma via de ação que pode ser levada em consideração como novo alvo terapêutico.⁽¹²⁶⁾ Por outro lado, ressalto um ponto importante do presente estudo, que foi avaliar tanto monócitos circulantes quanto os presentes no tecido. A literatura carece de tais análises, mas os poucos dados publicados acerca desta abordagem demonstram a correlação entre estes dois compartimentos celulares para o desenvolvimento da DCrohn e sua decorrente cronicidade.⁽¹¹⁰⁾

5 CONCLUSÃO

1. A doença de Crohn é uma doença complexa e que afeta diferentes ramos da resposta imune do paciente, alterando a homeostasia intestinal e a interação com a microbiota intestinal. Os dados aqui apresentados nos sugerem que monócitos possuem papel importante na inflamação intestinal decorrente da doença de Crohn, podendo agir como um *hub* de recrutamento de novas células imunes pela produção de quimiocinas, estimulando a inflamação por meio da produção de citocinas e em partes da resposta imune adaptativa em possíveis interações com células dendríticas e células T. Ademais nossos dados sugerem uma similaridade entre os monócitos circulantes e teciduais, ainda que possuam assinaturas gênicas específicas de cada tecido, mas tal similaridade demonstra que a avaliação de monócitos circulantes em busca de marcadores pode ser interessante como perspectiva futura para a prática clínica.

6 APRESENTAÇÃO DO ARTIGO

Rosseto-Welter EA, D'argenio-Garcia L, Blasco Tavares Pereira Lopes F, Zulim Carvalho AE, Flaquer F, Severo-Lemos V, Viero Nora CC, Steinwurz F, **Pires Garcia Oliveria L**, Aloia T, Rizzo LV, Pitangueira Manguiera CL, **Carvalho KI**. Biologic agents in Crohn's patients reduce CD4+ T cells activation and are inversely related to treg cells. Can J Gastroenterol Hepatol. 2022;2022:1307159. doi: 10.1155/2022/1307159.

7 MÉTRICAS

7.1 Métricas do periódico

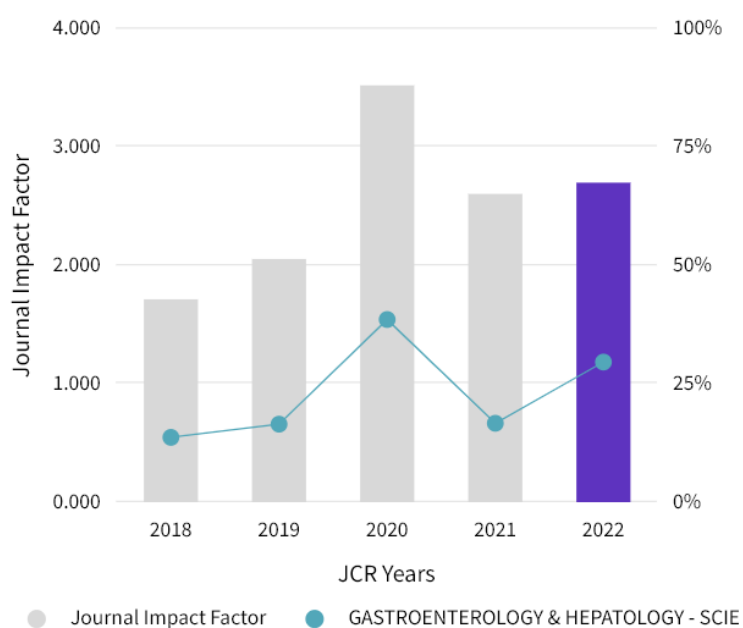
Métricas do periódico nos últimos cinco anos.

7.1.1 Fator de impacto

Periódico: Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology

ISSN: 2291-2789 (Print); 2291-2797 (Electronic)

Fator de impacto 2022: 2.7



7.2 Métricas do artigo

7.2.1 Citações

Há uma citação para o artigo nas bases de dados *Scopus*, *Web of Science* e *Google Scholar*.

Citação recebida	Scopus/Web of Science/Google Scholar	Capítulo de livro	Total
Duan S, Cao Y, Chen P, Yang Y, Zhang Y. Circulating and intestinal regulatory T cells in inflammatory bowel disease: A systemic review and meta-analysis. Int Rev Immunol. 2023:1-12.	1	0	1

Avaliação realizada em 14 de novembro de 2023.

7.2.2 Altmetria

Dados altmétricos coletados em 14 de novembro de 2023.

Escore	Variáveis	Quantidade
	Menções em rede	1
	X	1
	Citações	1
	Dimensions	1
	Capítulo de livro	0
	Artigo	1
	Leituras	8
	Mendeley	8

7.3 Métricas do autor

7.3.1 Redes científicas

Participação do autor nas redes científicas e seus respectivos endereços eletrônicos, onde o autor registra e disponibiliza suas publicações.

Rede científica	Link para acesso ao perfil
ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5464-1039
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/2664902916604777
ScopusID	https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57191572913
Publons/ResearcherID	https://www.webofscience.com/wos/author/record/E-7256-2017

7.3.2 Trabalhos publicados

Trabalhos publicados e indexados na base de dados referencial *Web of Science*.

Publicações				
Ano	FI	Categoria	Referência	Citações
2017	3.3	Article	Cardoso EO, Conti BJ, Santiago KB, Conte FL, Oliveira LP , Hernandes RT, et al. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. J Pharm Pharmacol. 2017;69(1):99-108.	21
2019	7.2	Article	Mora DP, Santiago KB, Conti BJ, de Oliveira Cardoso E, Conte FL, Oliveira LP , et al. The chemical composition and events related to the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: a comparative assessment of Colombian samples. Phytother Res. 2019;33(3):591-601.	9
2016	3.3	Article	Oliveira LP , Conte FL, Cardoso EO, Conti BJ, Santiago KB, Golim MA, et al. Immunomodulatory/ inflammatory effects of geopropolis produced by <i>Melipona fasciculata</i> Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. J Pharm Pharmacol. 2016;68(12):1551-8.	5
2019	6.1	Article	Oliveira LP , Conte FL, de Oliveira Cardoso E, Conti BJ, Santiago KB, de Assis Golim M, et al. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. Life Sci. 2019;217:81-90.	3
2021	3.3	Article	Conte FL, Santiago KB, Conti BJ, Cardoso EO, Oliveira LP , Feltran GDS, Zambuzzi WF, Golim MA, Cruz MT, Sforcin JM. Propolis from southeastern Brazil produced by <i>Apis mellifera</i> affects innate immunity by modulating cell marker expression, cytokine production and intracellular pathways in human monocytes. J Pharm Pharmacol. 2021;73(2):135-44.	10

7.3.3 Mediana do fator de impacto dos trabalhos publicados

Fator de impacto das publicações	Mediana
3.3	3.3
3.3	
7.2	
6.1	
3.3	

7.3.4 Citações recebidas

Publicações x Citações		
Ano	Publicações	Citações
2016	1	5
2017	1	21
2019	2	12
2021	1	10
Total	5	48

7.3.5 H-index e m-quociente

Cálculo do <i>h-index</i>	
Tópicos	Dados
Quantidade de publicações:	5
Soma do número de citações:	48
Artigos que receberam citações:	5
Média de citações por item:	9,6
<i>h-index</i>:	4

Cálculo do m-quociente		
<i>h-index</i>	3	1
Número de anos de publicação	3	

Publicações – <i>h-index</i>				
Ano	FI	Categoria	Referência	Citações
2017	3.3	Article	Cardoso EO, Conti BJ, Santiago KB, Conte FL, Oliveira LP , Hernandes RT, et al. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. J Pharm Pharmacol. 2017;69(1):99-108.	21
2021	3.3	Article	Conte FL, Santiago KB, Conti BJ, Cardoso EO, Oliveira LP , Feltran GDS, Zambuzzi WF, Golim MA, Cruz MT, Sforcin JM. Propolis from southeastern Brazil produced by Apis mellifera affects innate immunity by modulating cell marker expression, cytokine production and intracellular pathways in human monocytes. J Pharm Pharmacol. 2021;73(2):135-44.	10
2019	7.2	Article	Mora DPP, Santiago KB, Conti BJ, de Oliveira Cardoso E, Conte FL, Oliveira LP , et al. The	9

chemical composition and events related to the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: a comparative assessment of Colombian samples. *Phytother Res.* 2019;33(3):591-601.

2016	3.3	Article	Oliveira LP , Conte FL, Cardoso EO, Conti BJ, Santiago KB, Golim MA, et al. Immunomodulatory/ inflammatory effects of geopropolis produced by <i>Melipona fasciculata</i> Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. <i>J Pharm Pharmacol.</i> 2016;68(12):1551-8.	5
2019	6.1	Article	Oliveira LP , Conte FL, de Oliveira Cardoso E, Conti BJ, Santiago KB, de Assis Golim M, et al. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. <i>Life Sci.</i> 2019;217:81-90.	3

8 ANEXOS

Anexo 1. Dados de *bulk* RNA-seq

Nosso primeiro passo foi estabelecer as características do banco de dados IBD TaMMA. Todas as características foram plotadas em um plano cartesiano baseada em similaridades individuais. O banco de dados é formado por 3852 indivíduos, e no presente estudo relacionamos a composição etária, e distribuição entre os sexos, os tipos de metodologia utilizada, o tipo de tecido com base na expressão gênica e o tratamento utilizado pelos pacientes. Inicialmente podemos observar que a faixa de idade entre os indivíduos está abaixo dos 20 anos (Figura Suplementar 1A), enquanto a distribuição entre o sexo masculino e feminino fica semelhante (Figura Suplementar 1B).

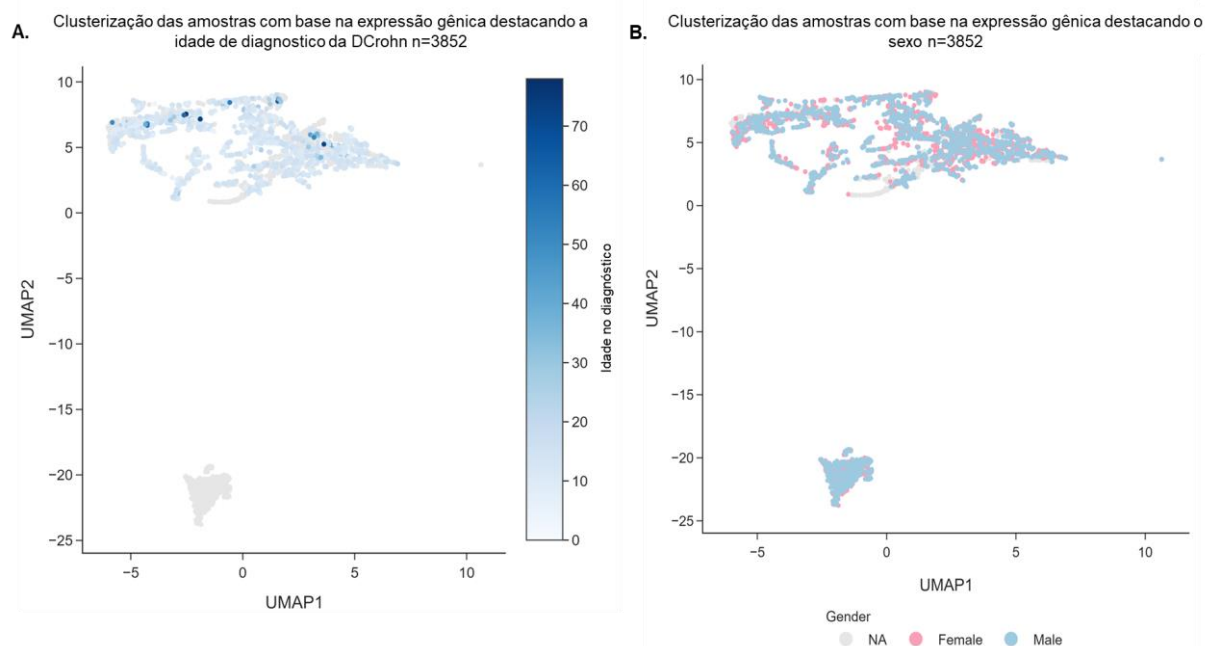


Figura Suplementar 1. Os indivíduos presentes no banco de dados são majoritariamente menores de 20 anos. A. caracterização com base na idade na qual foi diagnosticado o quadro de Crohn, majoritariamente representada pelo tom azul claro que corresponde a indivíduos com menos de 20 anos de idade e B. caracterização da com base no sexo de cada indivíduo incluídos no banco de dados

Após a caracterização com base na idade de diagnóstico e sexo dos pacientes, observamos que as amostras coletadas destes indivíduos foram submetidas, em sua maioria, a metodologia de transcriptômica para a obtenção dos dados de expressão gênica (Figura Suplementar 2). Entretanto é possível observar um segundo

grupo formado a partir da utilização da metatranscriptômica, protocolo o qual é utilizado para a obtenção de expressão gênica do microbioma. No presente estudo iremos nos referir somente a expressão gênica dos pacientes, deixando assim a metatranscriptômica do microbioma intestinal fora dos resultados e discussão.

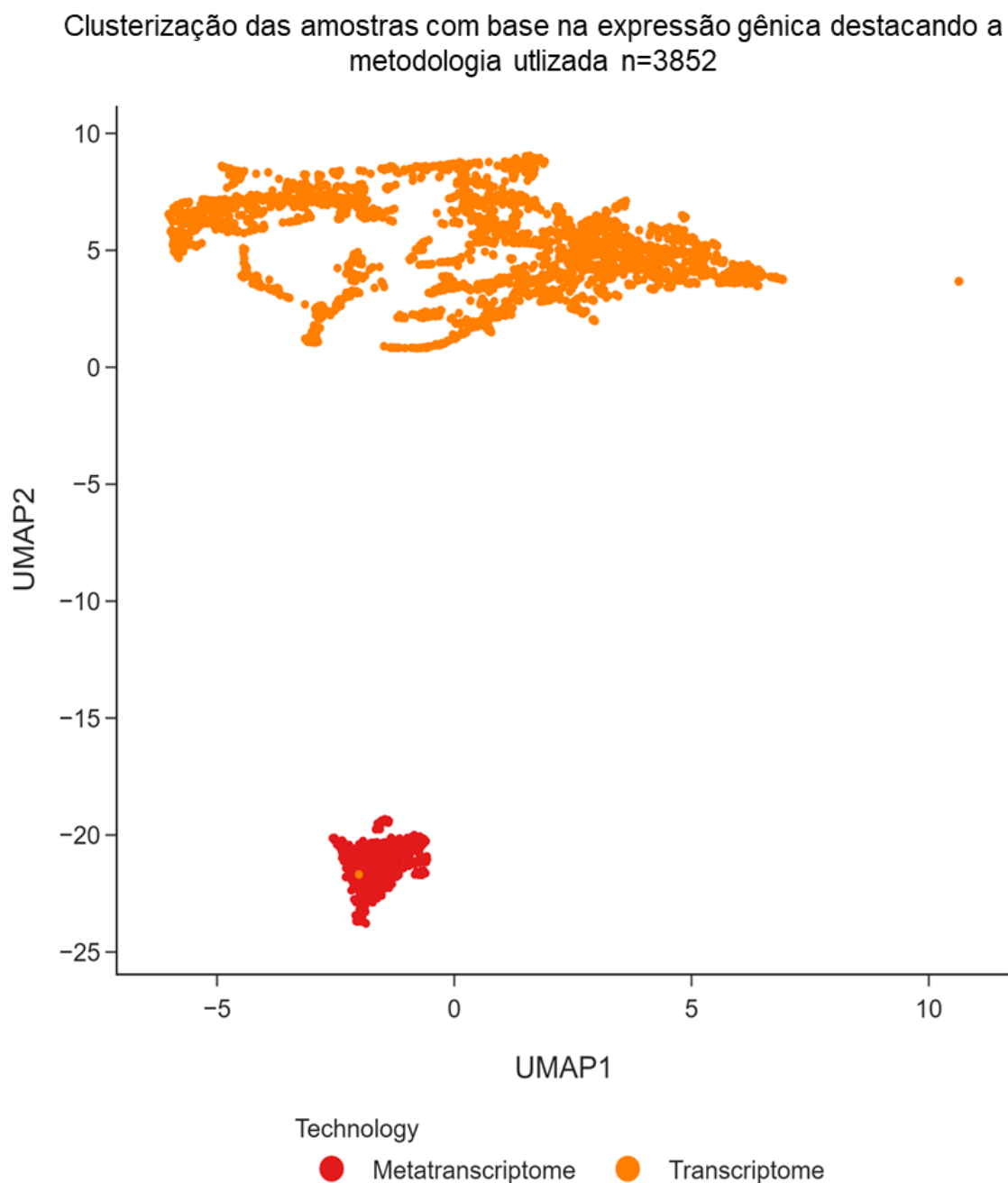


Figura Suplementar 2. Caracterização com base na tecnologia usada para geração dos dados de expressão gênica

Por fim, como última parte da caracterização do banco de dados, apresentamos como a expressão gênica dos tecidos se distribuem quanto às

similaridades entre si, e os tratamentos utilizados pelos indivíduos. Aspecto importante do banco de dados é a dispersão dos tecidos segundo suas similaridades. Utilizando o algoritmo de clusterização UMAP podemos observar uma sobreposição dos monócitos com tecidos intestinais como reto e células do sangue, estando mais concentrados em uma região do plano cartesiano, enquanto, células do íleo e cólon estão dispersos por todo o gráfico, demonstrando assim uma amplitude no perfil transcricional (Figura Suplementar 3A). Ademais, por possuir um perfil etário jovem, o banco de dados acaba por englobar pacientes que nunca fizeram uso de qualquer tratamento para a DCrohn, como é demonstrado na figura Suplementar 3B. A maioria dos pacientes não estão fazendo uso de nenhuma terapia, enquanto alguns poucos estão fazendo uso do anticorpo anti- $\beta 7$ (etrolizumab).

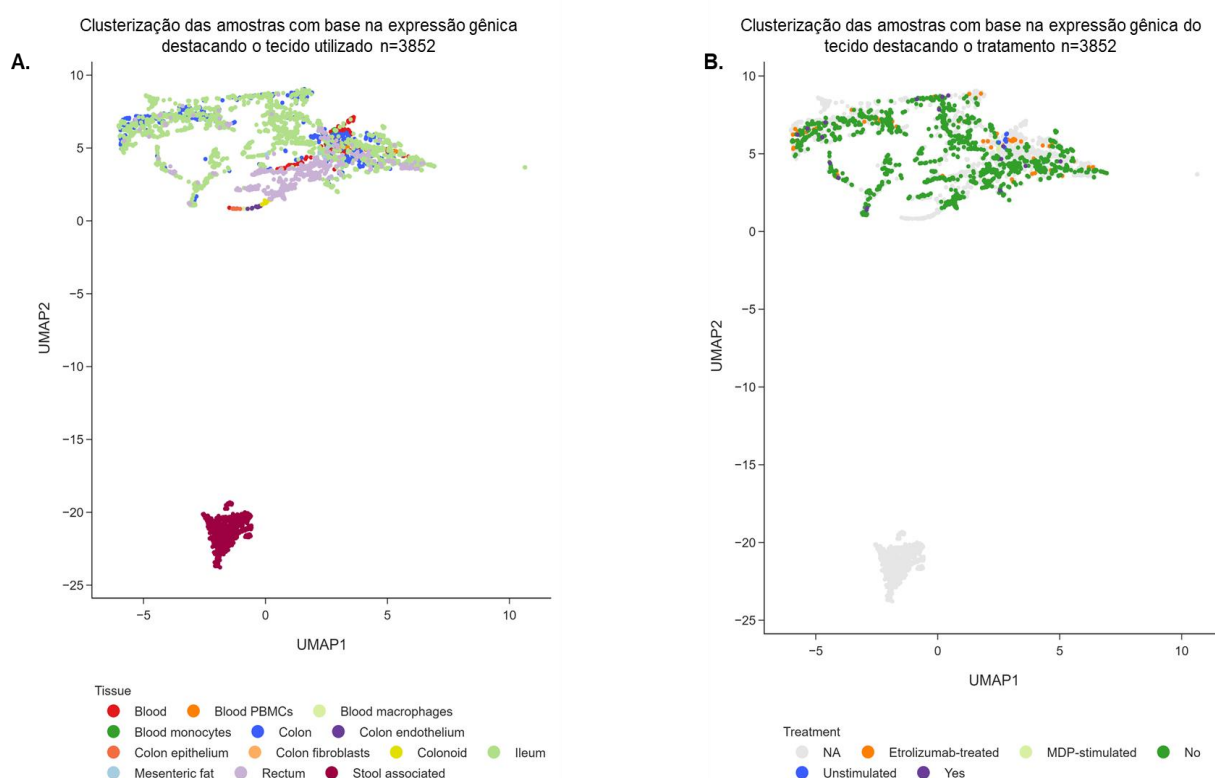


Figura Suplementar 3. A clusterização por UMAP demonstra proximidade entre monócitos e os tecidos de biópsia intestinal. A. clusterização segundo a amostra utilizada para obtenção de material genético, e B. dispersão das amostras com base na expressão gênica tendo o tratamento utilizado pelos indivíduos colocados em destaque

Após termos caracterizado o banco de dados, buscamos quais genes estão diferencialmente expressos na comparação do sangue total de pacientes e indivíduos saudáveis. Nós observamos, entre os dois grupos de indivíduos, 4589 genes *upregulated* em pacientes enquanto 1789 estavam *downregulated*, na comparação entre

o sangue de indivíduos saudáveis e pacientes (Figura Suplementar 4, $FDR < 0,00005$), sendo que nenhum destes genes se repetiam entre os *downregulated* e *upregulated*, tendo assim um perfil único. Este grande número de DEGs na comparação entre pacientes e indivíduos saudáveis deixa claro como várias vias e tipos celulares podem estar envolvidos na patologia.

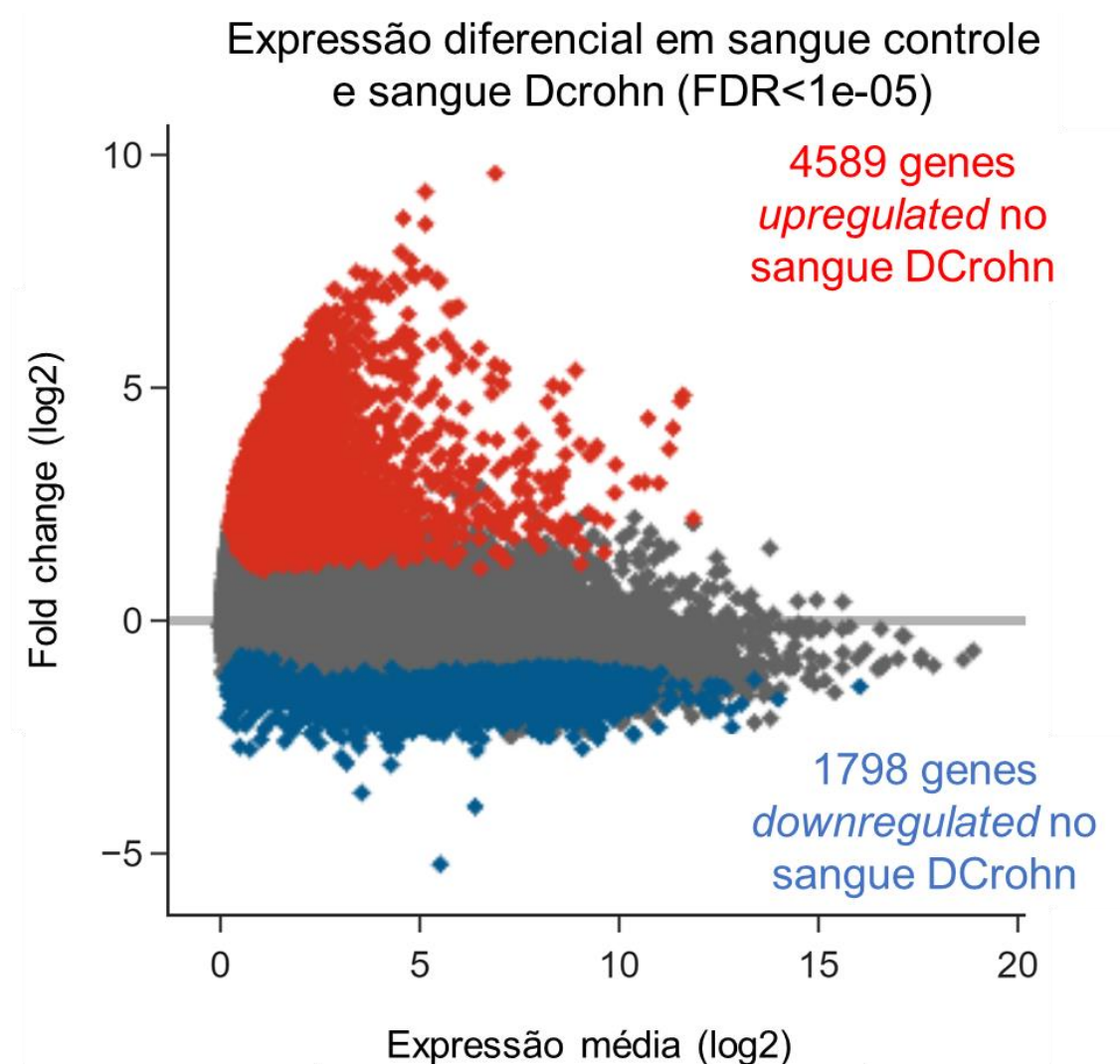


Figura Suplementar 4. Pacientes portadores da doença de Crohn apresentam mais genes diferencialmente *upregulated*. Dotplot mostrando os genes diferencialmente expressos na comparação entre sangue de indivíduos saudáveis e portadores da doença de Crohn. $FDR < 0,00005$

Além dos genes e vias celulares diferencialmente expressos, também podem demonstrar características importantes da patologia. Na figura Suplementar 5 podemos observar que das 30 vias com maior diferença na comparação entre os grupos saudável e paciente, 10 estão diretamente relacionadas à resposta imune inata e/ou adaptativa, tanto na forma de vias *upregulated* quanto *downregulated*. Ademais, também

estão alteradas vias relacionadas a adesão entre células e à integridade epitelial, demonstrando mais uma vez se tratar de uma doença complexa que afeta tanto células imunes quanto o epitélio intestinal de diferentes formas.



Figura Suplementar 5. Vias importantes da resposta imune, como apoptose e resposta frente a microbiota, estão alteradas. Anotação das 30 vias mais diferencialmente expressas na comparação entre sangue de indivíduos saudáveis e portadores de Crohn. FDR < 1^{e-10}

Tomando por base as vias mais diferencialmente expressas mostradas na figura 5, nós escolhemos, para serem analisadas mais detalhadamente, aquelas que podem estar envolvidas no desenvolvimento quadro patológico da DCrohn

com base no sistema imune, como as vias da resposta imune inata, complemento, resposta antimicrobiana e degranulação de neutrófilos, e a via da regulação da apoptose, que apesar de não ser diretamente relacionada à resposta imune, possui aspecto importante para tal. Dando sequência aos achados, fomos avaliar a expressão gênica de receptores de superfície e citocinas relacionados à resposta imune inata. Inicialmente nós observamos uma ampla distribuição da expressão de CD14, CD16 (FCGR3A), CD163 e TLR4 nos tecidos do íleo e reto, entretanto no colón a expressão de CD14 e TLR4 possuem menor amplitude (Figura Suplementar 6A). O sangue por sua vez apresenta somente o CD16 com grande variabilidade, uma vez que este receptor está presente na superfície de uma ampla gama de células.⁽⁶²⁾ O CD163 aparece com uma tendência de expressão aumentada em monócitos circulantes, entretanto não possui diferença estatística (dados não mostrados), entretanto no sangue total há uma diminuição da expressão deste receptor no grupo paciente em comparação aos indivíduos saudáveis (Figura Suplementar 6B, $p < 0,05$).

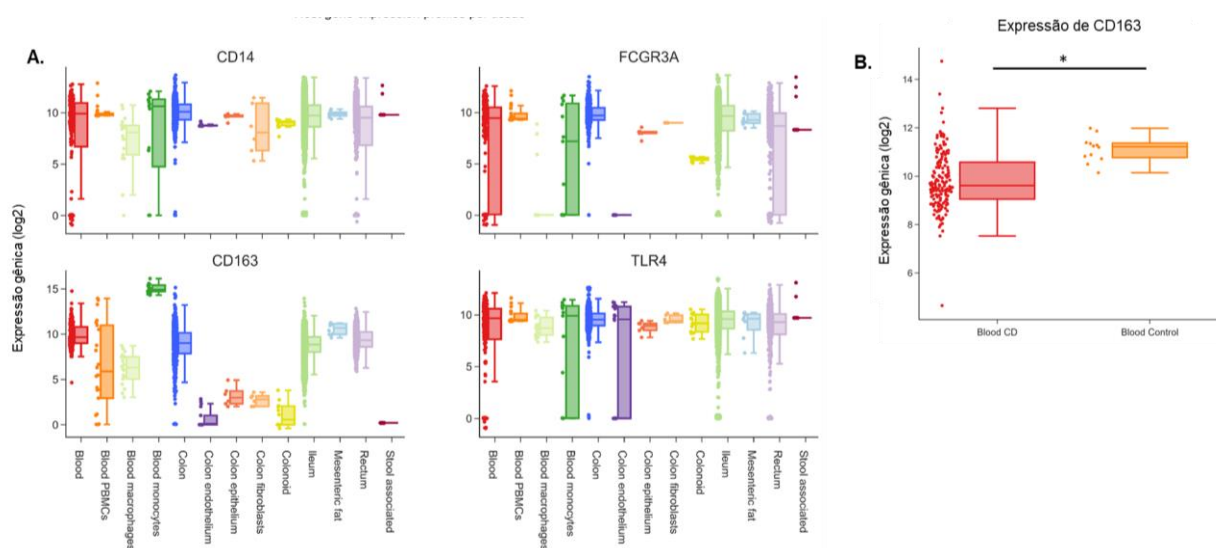


Figura Suplementar 6. A expressão de *CD163* está alterada na superfície de células presentes no sangue. A. Perfil de expressão de genes em diferentes tecidos dos pacientes portadores de Crohn e B. expressão de *CD163* no sangue total de pacientes portadores de Crohn e indivíduos saudáveis

Continuando com a análise da resposta imune inata e seus mediadores, fomos avaliar a expressão de citocinas envolvidas no processo inflamatório, uma vez que são importantes marcadores de doenças inflamatórias.⁽¹²⁷⁾ Apesar das citocinas serem importantes para o processo inflamatório, não observamos diferenças significativas nos tecidos avaliados (Figura Suplementar 7). Destaca-se ainda uma ampla expressão dos genes das citocinas IL-1 β , TNF e IL-17, sendo que somente a IL10 e

IL23A que apresentaram baixa amplitude no sangue e monócitos circulantes. Além das citocinas também observamos ampla expressão do receptor intracelular NLRP3, responsável pelo reconhecimento de PAMPs, DAMPs e iniciação do inflamassoma,⁽¹²⁸⁾ sendo assim um importante receptor celular que pode não refletir o *status* da doença, dado sua ampla expressão gênica.

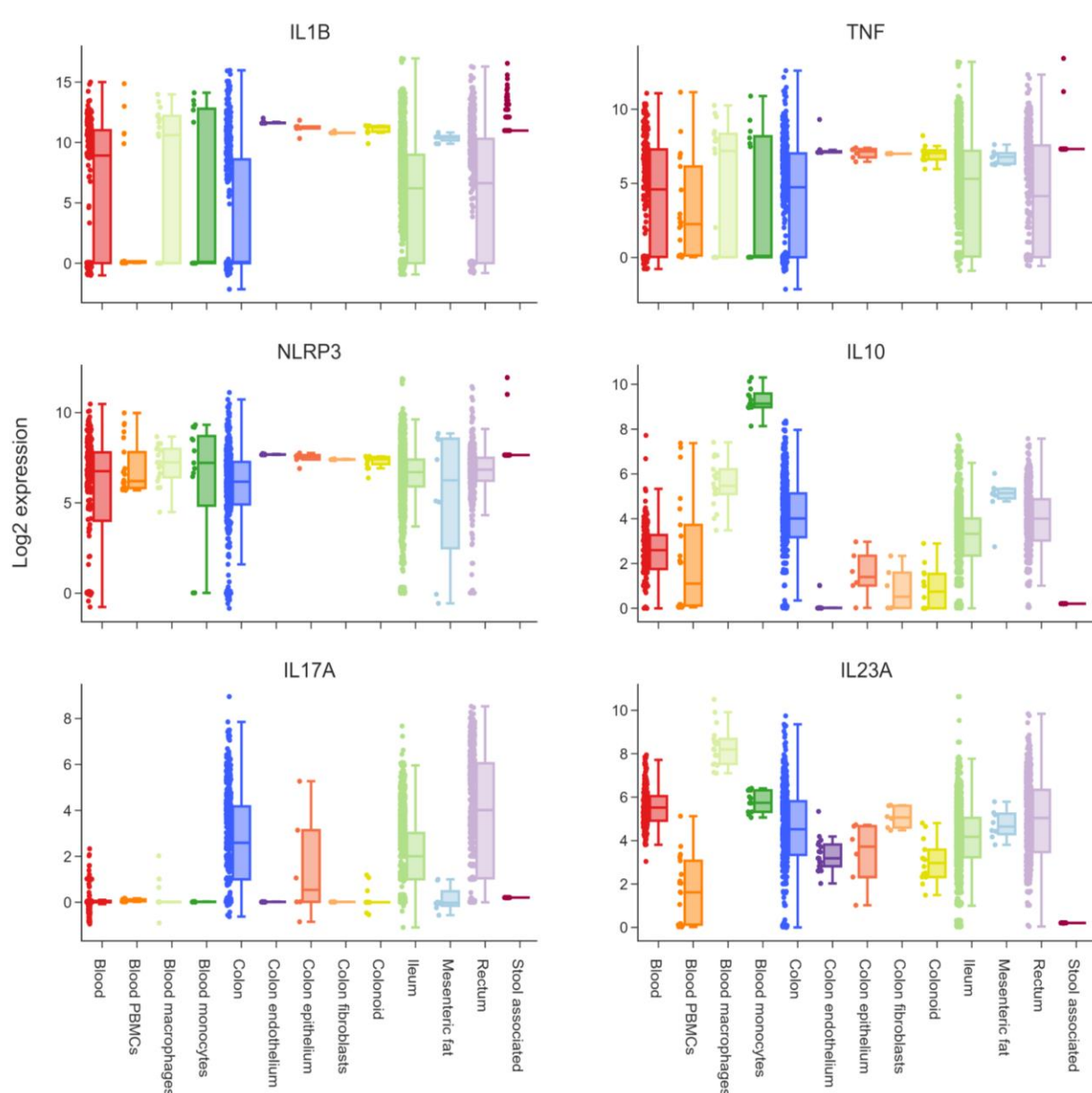


Figura Suplementar 7. A expressão de citocinas mostra uma grande variabilidade entre os tecidos. Perfil de expressão de genes de citocinas em diferentes tecidos dos pacientes portadores de Crohn

Após avaliarmos a expressão de moléculas de superfície e citocinas, fomos analisar genes relacionados a via do complemento, uma vez que esta via se apresentou *upregulated* no sangue de pacientes portadores de Crohn, segundo o

enriquecimento do GO. A expressão destes genes nos tecidos avaliados não apresentou diferenças, e ainda possui grande variabilidade, especialmente nas amostras de tecido intestinal (Figura Suplementar 8A), entretanto o KRT1, gene relacionado à produção de queratina e integridade epitelial, está aumentado no sangue de pacientes em comparação com indivíduos saudáveis (Figura Suplementar 8B).

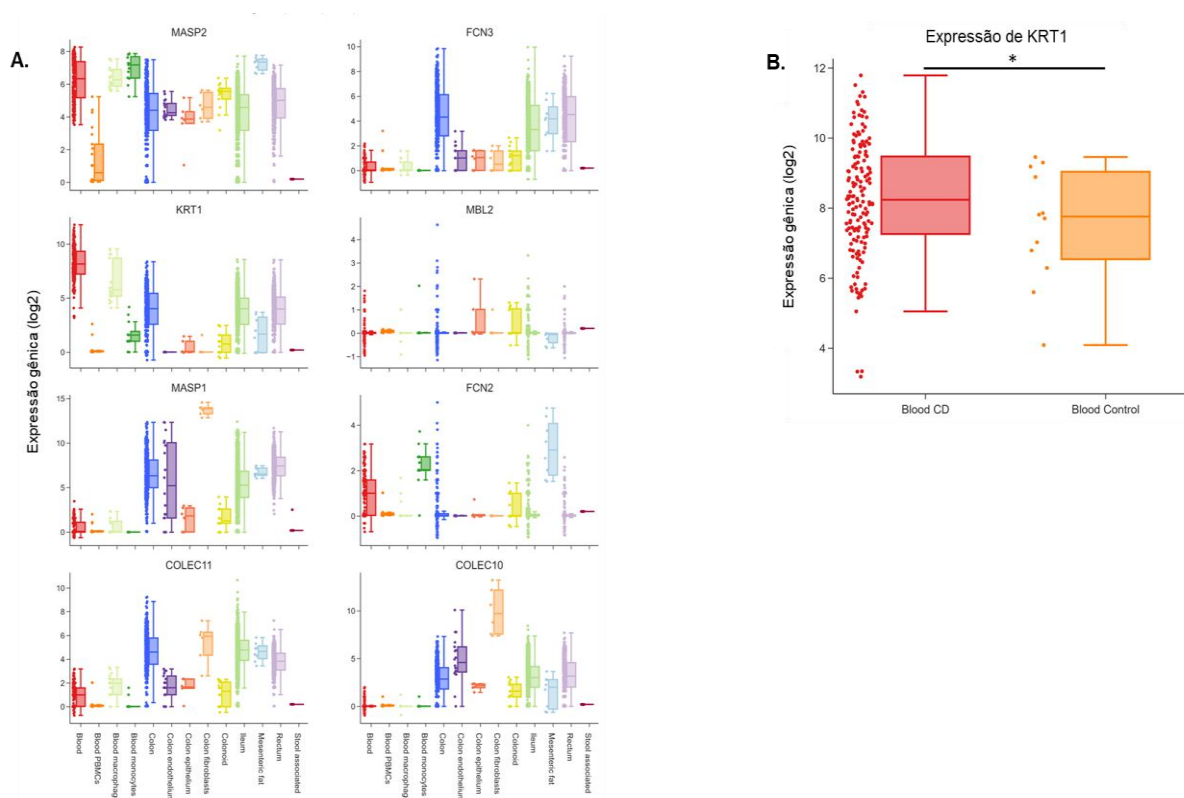


Figura Suplementar 8. A ação do sistema complemento na doença é pouco expressiva. A. Perfil de expressão de genes em diferentes tecidos dos pacientes portadores de Crohn, B. expressão de *KRT1* no sangue total de pacientes e indivíduos saudáveis

Além das vias de sinalização por citocinas e complemento, as vias intracelulares de resposta imune inata frente a microrganismos podem estar também envolvidas na patologia. A expressão de genes ligados a formação do inflamassoma (CARD9, PYCARD, NOD2), o S100A12 e CD209 não apresentaram diferenças de expressão nos tecidos avaliados (Figura Suplementar 9A), porém o JAK3 estava diminuído no sangue total dos pacientes em comparação aos indivíduos saudáveis (Figura Suplementar 9B).

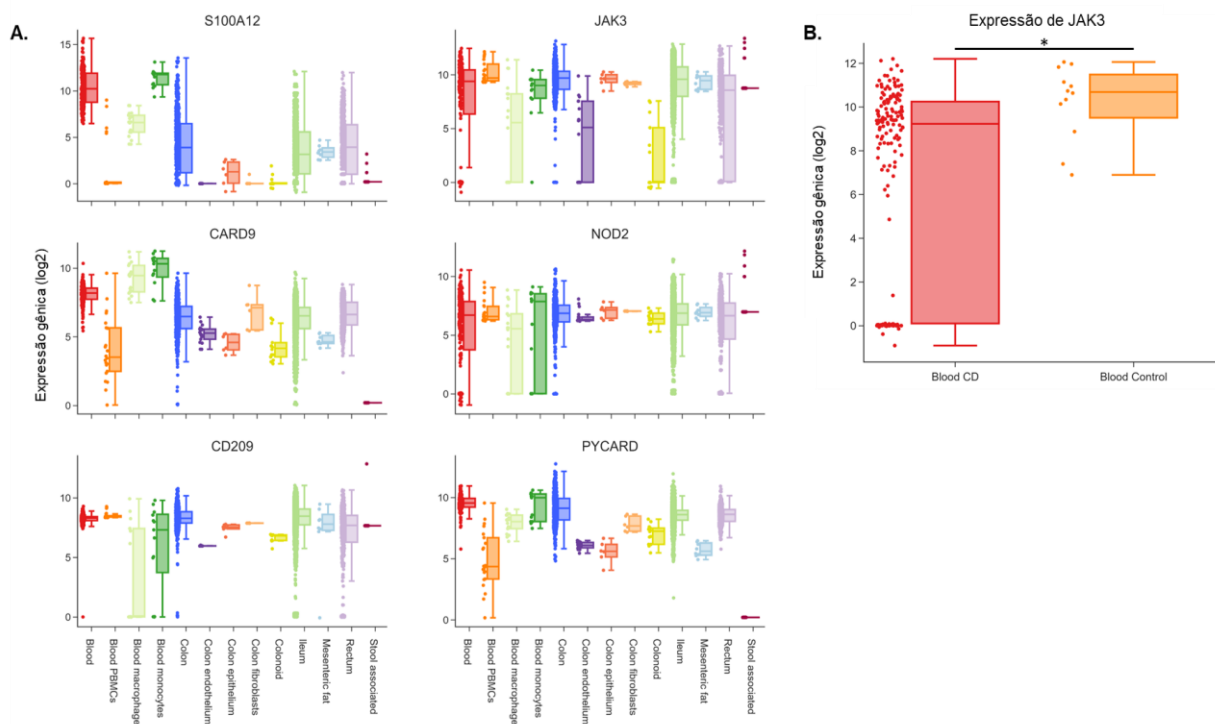


Figura Suplementar 9. JAK3 tem sua expressão diminuída em pacientes portadores de Crohn. A. Perfil de expressão de genes em diferentes tecidos dos pacientes portadores de Crohn, B. expressão de JAK3 no sangue total de pacientes e indivíduos saudáveis

A expressão de quimiorreceptores nas células imunes é de suma importância para seu recrutamento aos sítios inflamados, especialmente quando tratados de células do sistema imune inato como neutrófilos e monócitos. Contudo podemos observar que não houve diferença quanto a expressão de CXCR1, CCR2 e CXCR2 no sangue total (Figura Suplementar 10A), mas a expressão de CX3CR1 está diminuída no sangue de pacientes em relação aos indivíduos saudáveis (Figura Suplementar 10B), conjuntamente podemos observar a diminuição de CD33 (Figura Suplementar 10C). Vale ressaltar que também observamos a diminuição da CD38 no sangue dos pacientes em comparação ao grupo saudável (Figura Suplementar 10C).

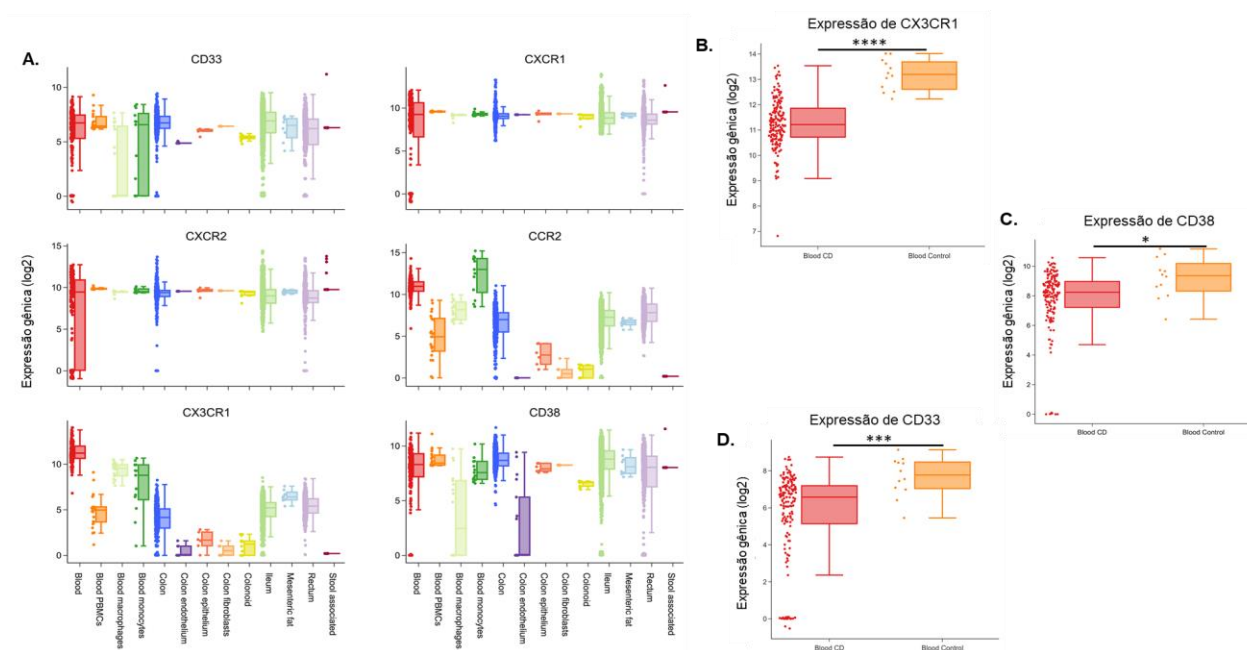


Figura Suplementar 10. A. Perfil de expressão de genes em diferentes tecidos dos pacientes portadores de Crohn, B. expressão de *CX3CR1* no sangue total de pacientes e indivíduos saudáveis, C. expressão de *CD38* no sangue total de pacientes portadores de Crohn e indivíduos saudáveis e D. expressão de *CD33* no sangue total de pacientes portadores de Crohn e indivíduos saudáveis

Avaliamos também a expressão de CASP2 e CASP9, duas proteínas envolvidas no processo de morte celular. Apesar de ambos os genes apresentaram ampla variabilidade de expressão nos tecidos intestinais (Figura Suplementar 11A) foi possível observar menor expressão destes dois genes no sangue de indivíduos portadores de Crohn em comparação com indivíduos saudáveis (Figura Suplementar 11B e C), indicando assim um menor comprometimento das células circulantes com esta via de morte celular.

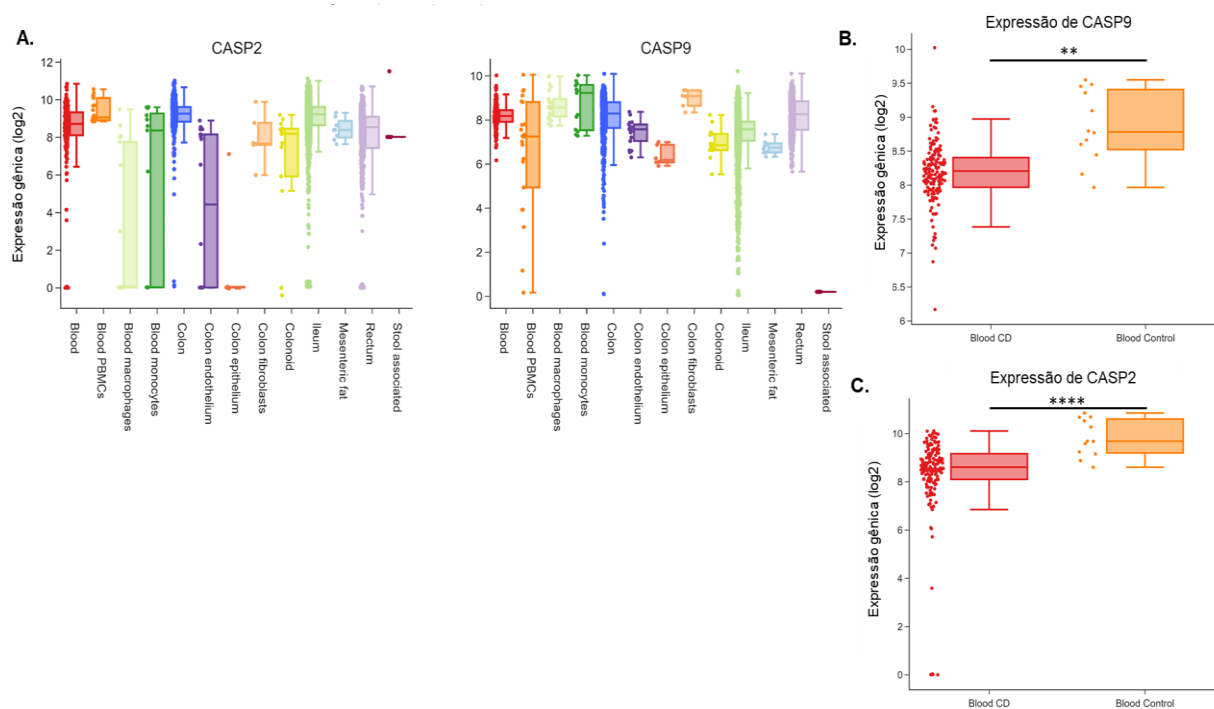


Figura Suplementar 11. Caspase 2 e 9 envolvidas no inflamassoma estão diminuídas nos pacientes de Crohn. A. Perfil de expressão de genes em diferentes tecidos dos pacientes portadores de Crohn, B. expressão de *CASP9* em monócitos de pacientes portadores de Crohn e indivíduos saudáveis, C. expressão de *CASP2* no sangue total de pacientes portadores de Crohn e indivíduos saudáveis

9 REFERÊNCIAS

1. Ogobuiro I, Gonzales J, Shumway KR, Tuma F. Physiology, Gastrointestinal. 2023 Apr 8. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. Bookshelf ID: NBK537103
2. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007;117(3):514–21.
3. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):458–66.
4. Stange EF, Wehkamp J. Recent advances in understanding and managing Crohn's disease. *F1000 Res*. 2016;5:2896.
5. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease part 1: ulcerative colitis—pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev*. 2003;8(3):247–83.
6. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017;389(10080):1756–70.
7. Wang R, Li Z, Liu S, Zhang D. Global, regional and national burden of inflammatory bowel disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. *BMJ Open*. 2023;13(3):e065186.
8. Souza MM, Belasco AG, Aguilar-Nascimento JE. [The epidemiological profile of patients with inflammatory Bowel disease in the State of Mato Grosso]. *Rev Bras Coloproctol*. 2008;28(3):324–8. Portuguese.
9. Oliveira FM, Emerick AP, Soares EG. [Epidemiology aspects of inflammatory bowel disease in the east region of Minas Gerais State]. *Cien Saude Colet*. 2010;15 Suppl 1:1031–7. Portuguese.
10. Kleinubing-Júnior H, Pinho MS, Ferreira LC, Bachtold GA, Merki A. Outpatients profile with inflammatory bowel disease. *Arq Bras Cir Dig*. 2011;24(3):200–3.
11. Barros PA, Silva AM, Lins Neto MA. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease patients on biologic therapy at a public hospital in Alagoas. *J Coloproctol (Rio J)*. 2014;34(3):131–5.
12. Santos RM, Carvalho AT, Silva KD, Sá SP, Santos AH, Sandinha MR. Inflammatory bowel disease: outpatient treatment profile. *Arq Gastroenterol*. 2017;54(2):96–100.
13. Victoria CR, Sassak LY, Nunes HR. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2009;46(1):20–5.
14. Gasparini RG, Sassaki LY, Saad-Hossne R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. *Clin Exp Gastroenterol*. 2018;11:423–9.
15. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):307–17.
16. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427–34.
17. Cohen SA, Gold BD, Oliva S, Lewis J, Stallworth A, Koch B, et al. Clinical and mucosal improvement with specific carbohydrate diet in pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59(4):516–21.
18. Tremaine WJ. Diagnosis and treatment of indeterminate colitis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2011;7(12):826–8.

19. Roggenbuck D, Reinhold D, Baumgart DC, Schierack P, Conrad K, Laass MW. Autoimmunity in Crohn's Disease-A Putative Stratification Factor of the Clinical Phenotype. *Adv Clin Chem*. 2016;77:77-101.
20. Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Meyer zum Büschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut*. 1999;44(6):812-8.
21. Granlund A, Flatberg A, Østvik AE, Drozdov I, Gustafsson BI, Kidd M, et al. Whole genome gene expression meta-analysis of inflammatory bowel disease colon mucosa demonstrates lack of major differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56818.
22. Ramos GP, Faubion WA, Papadakis KA. Targeting specific immunologic pathways in Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46(3):577-88.
23. Ohtani K, Ohtsuka Y, Ikuse T, Baba Y, Yamakawa Y, Aoyagi Y, et al. Increased mucosal expression of GATA-3 and STAT-4 in pediatric ulcerative colitis. *Pediatr Int*. 2010;52(4):584-9.
24. Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(27):4280-8.
25. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, et al. IL23 Differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2008;57(12):1682-9.
26. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(1):65-70.
27. Saruta M, Yu QT, Avanesyan A, Fleshner PR, Targan SR, Papadakis KA. Phenotype and effector function of cc chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J Immunol*. 2007;178(5):3293-300.
28. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon production in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2009;58(12):1629-36.
29. Caparrós E, Wiest R, Scharl M, Rogler G, Gutiérrez Casbas A, Yilmaz B, et al. Dysbiotic microbiota interactions in Crohn's disease. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1949096.
30. Franzosa EA, Sirota-Madi A, Avila-Pacheco J, Fornelos N, Haiser HJ, Reinker S, et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2018;4(2):293-305.
31. St-Pierre J, Chadee K. How the discovery of TNF- α has advanced gastrointestinal diseases and treatment regimes. *Dig Dis Sci*. 2014;59(4):712-5.
32. Peyrin-Biroulet L, Lémann M. Review article: remission rates achievable by current therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33(8):870-9.
33. Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut*. 2013;62(11):1653-64.
34. McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut*. 2007;56(10):1333-6.
35. Teng MW, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM, et al. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med*. 2015;21(7):719-29.
36. Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, Panés J, Kaser A, Ferrante M, et al. Induction therapy with the selective interleukin-23 inhibitor risankizumab in patients with moderate-to-

- severe Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 2017;389(10080):1699-709.
37. Blauvelt A, Papp KA, Griffiths CE, Randazzo B, Wasfi Y, Shen YK, et al. Efficacy and safety of guselkumab, an anti-interleukin-23 monoclonal antibody, compared with adalimumab for the continuous treatment of patients with moderate to severe psoriasis: results from the phase III, double-blinded, placebo- and active comparator-controlled VOYAGE 1 trial. *J Am Acad Dermatol*. 2017;76(3):405–17.
 38. Sands BE, Chen J, Feagan BG, Penney M, Rees WA, Danese S, et al. Efficacy and safety of MEDI2070, an antibody against interleukin 23, in patients with moderate to severe Crohn's disease: a phase 2a study. *Gastroenterology*. 2017;153(1):77–86.e6.
 39. Tausend W, Downing C, Tying S. Systematic review of interleukin-12, interleukin-17, and interleukin-23 pathway inhibitors for the treatment of moderate-to-severe chronic plaque psoriasis: ustekinumab, briakinumab, tildrakizumab, guselkumab, secukinumab, ixekizumab, and brodalumab. *J Cutan Med Surg*. 2014;18(3):156-69.
 40. Hosokawa T, Kusugami K, Ina K, Ando T, Shinoda M, Imada A, et al. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999;14(10):987–96.
 41. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, et al. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut*. 1995;36(1):45–9.
 42. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PD, et al.; Secukinumab in Crohn's Disease Study Group. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*. 2012;61(12):1693–700.
 43. Brazilian Study Group of Inflammatory Bowel Diseases. Consensus guidelines for the management of inflammatory bowel disease. *Arq Gastroenterol*. 2010;47(3):313-25.
 44. Hossene RS, Coy CS. Atualização em doenças inflamatórias intestinais: conectando ciência à prática diária: curso de atualização do GEDIIB na SBAD 2019. Fortaleza: Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal do Brasil; 2019 [citado 2023 Set 15]. Disponível em: https://gediib.org.br/wp-content/uploads/2020/09/Livro_GEEDIB_2019_Rev2-2.pdf
 45. De Vries LC, Wildenberg ME, De Jonge WJ, D'Haens GR. The future of janus kinase inhibitors in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2017;11(7):885–93.
 46. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009;228(1):273–87.
 47. Ansari US, Abraham BP. S711 Efficacy of tofacitinib in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2021;116(1):S324.
 48. Fenster M, Alayo QA, Khatiwada A, Wang W, Dimopoulos C, Gutierrez A, et al. Real-world effectiveness and safety of tofacitinib in crohn's disease and ibd-u: a multicenter study from the TROPIC consortium. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021;19(10):2207–2209.e3.
 49. Atreya R, Neurath MF. New therapeutic strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol*. 2008;1(3):175–82.
 50. Danese S. New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. *Gut*. 2012;61(6):918–32.
 51. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331–41.
 52. MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1768–75.

53. Bernardo D, Chaparro M, Gisbert JP. Human intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(7):e1700931.
54. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504–17.
55. García Rodríguez LA, González-Pérez A, Johansson S, Wallander MA. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(4):309–15.
56. Gradel KO, Nielsen HL, Schønheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology*. 2009;137(2):495–501.
57. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2012;156(5):350–9.
58. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RA, et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):39–49.
59. 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.
60. Li Yim AY, Duijvis NW, Ghiboub M, Sharp C, Ferrero E, Mannens MM, et al. Whole-genome DNA methylation profiling of CD14⁺ monocytes reveals disease status and activity differences in Crohn's disease patients. *J Clin Med*. 2020;9(4):1055.
61. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176460.
62. Chapuy L, Bsat M, Sarkizova S, Rubio M, Therrien A, Wassef E, et al. Two distinct colonic CD14⁺ subsets characterized by single-cell RNA profiling in Crohn's disease. *Mucosal Immunol*. 2019;12(3):703–19. Erratum in: *Mucosal Immunol*. 2020;13(2):381.
63. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008;67(2):152–9.
64. Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Bridts CH, Stevens WJ. Comparison of intracellular cytokine production with extracellular cytokine levels using two flow cytometric techniques. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003;55(1):52–8.
65. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):519–50.
66. Lopetuso LR, Chowdhry S, Pizarro TT. Opposing functions of classic and novel IL-1 family members in gut health and disease. *Front Immunol*. 2013;4:181.
67. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015;21(7):677–87.
68. Kelly A, Gunaltay S, McEntee CP, Shuttleworth EE, Smedley C, Houston SA, et al. Human monocytes and macrophages regulate immune tolerance via integrin $\alpha\beta 8$ -mediated TGF β activation. *J Exp Med*. 2018;215(11):2725–36.
69. Schleier L, Wiendl M, Heidbreder K, Binder MT, Atreya R, Rath T, et al. Non-classical monocyte homing to the gut via $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates macrophage-dependent intestinal wound healing. *Gut*. 2020;69(2):252–63.
70. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1–14.

71. Cheng Y, Zhu Y, Huang X, Zhang W, Han Z, Liu S. Association between TLR2 and TLR4 gene polymorphisms and the susceptibility to inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126803.
72. Madsen M, Graversen JH, Moestrup SK. Haptoglobin and CD163: captor and receptor gating hemoglobin to macrophage lysosomes. *Redox Rep*. 2001;6(6):386–8.
73. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(17):2352–63.
74. Bain CC, Schridde A. Origin, differentiation, and function of intestinal macrophages. *Front Immunol*. 2018;9:2733.
75. Ogino T, Nishimura J, Barman S, Kayama H, Uematsu S, Okuzaki D, et al. Increased Th17-inducing activity of CD14⁺ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1380–91.e1.
76. Gettler K, Giri M, Kenigsberg E, Martin J, Chuang LS, Hsu NY, et al. Prioritizing Crohn's disease genes by integrating association signals with gene expression implicates monocyte subsets. *Genes Immun*. 2019;20(7):577–88.
77. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7(3):311–7.
78. Kuroda N, Masuya M, Tawara I, Tsuboi J, Yoneda M, Nishikawa K, et al. Infiltrating CCR2⁺ monocytes and their progenies, fibrocytes, contribute to colon fibrosis by inhibiting collagen degradation through the production of TIMP-1. *Sci Rep*. 2019;9(1):8568.
79. Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, Kolaczowska E, Wong CH, Petri B, et al. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2⁺ monocytes at a site of sterile injury. *J Exp Med*. 2015;212(4):447–56.
80. Koscsó B, Kurapati S, Rodrigues RR, Nedjic J, Gowda K, Shin C, et al. Gut-resident CX3CR1^{hi} macrophages induce tertiary lymphoid structures and IgA response in situ. *Sci Immunol*. 2020;5(46):eaax0062.
81. Thiesen S, Janciauskiene S, Uronen-Hansson H, Agace W, Högerkorp CM, Spee P, et al. CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. *J Leukoc Biol*. 2014;95(3):531–41.
82. Grip O, Bredberg A, Lindgren S, Henriksson G. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(5):566–72.
83. Koch S, Kucharzik T, Heidemann J, Nusrat A, Luegering A. Investigating the role of proinflammatory CD16⁺ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(2):332–41.
84. Schwarzmaier D, Foell D, Weinhage T, Varga G, Däbritz J. Peripheral monocyte functions and activation in patients with quiescent Crohn's disease. *PLoS One*. 2013;8(4):e62761.
85. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486–99.
86. Pradhan K, Yi Z, Geng S, Li L. Development of exhausted memory monocytes and underlying mechanisms. *Front Immunol*. 2021;12:778830.
87. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017;356(6335):eaah4573.
88. Calzetti F, Tamassia N, Micheletti A, Finotti G, Bianchetto-Aguilera F, Cassatella MA. Human dendritic cell subset 4 (DC4) correlates to a subset of CD14^{dim}/CD16⁺⁺ monocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(6):2276–2279.e3.

89. Mannick EE, Bonomolo JC, Horswell R, Lentz JJ, Serrano MS, Zapata-Velandia A, et al. Gene expression in mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Clin Immunol.* 2004;112(3):247–57.
90. Hornsby E, Gadhok R, Yadon AN, Lindsay JO, Stagg AJ. Single cell RNA sequencing reveals a potential role for IFN γ in priming circulating monocytes for intestinal inflammatory function in Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2023;17 Suppl 1:i61–2.
91. Verstockt B, Verstockt S, Cremer J, Sabino J, Ferrante M, Vermeire S, et al. Distinct transcriptional signatures in purified circulating immune cells drive heterogeneity in disease location in IBD. *BMJ Open Gastroenterol.* 2023;10(1):e001003.
92. Corridoni D, Chapman T, Antanaviciute A, Satsangi J, Simmons A. Inflammatory bowel disease through the lens of single-cell RNA-seq technologies. *Inflamm Bowel Dis.* 2020;26(11):1658–68.
93. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(12):720–7.
94. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM 3rd, Zheng S, Butler A, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* 2021;184(13):3573–3587.e29.
95. Illicic T, Kim JK, Kolodziejczyk AA, Bagger FO, McCarthy DJ, Marioni JC, et al. Classification of low quality cells from single-cell RNA-seq data. *Genome Biol.* 2016;17(1):29.
96. Brennecke P, Anders S, Kim JK, Kolodziejczyk AA, Zhang X, Proserpio V, et al. Accounting for technical noise in single-cell RNA-seq experiments. *Nat Methods.* 2013;10(11):1093–5. Erratum in: *Nat Methods.* 2014;11(2):210.
97. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol.* 2019;20(1):296.
98. Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell.* 2015;161(5):1202–14.
99. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM 3rd, et al. Comprehensive Integration of single-cell data. *Cell.* 2019;177(7):1888–1902.e21.
100. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, Clarke DJ, Evangelista JE, Jenkins SL, et al. Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Curr Protoc.* 2021;1(3):e90.
101. Li X, Wang CY. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing. *Int J Oral Sci.* 2021;13(1):36.
102. Anderson A, Cherfane C, Click B, Ramos-Rivers C, Koutroubakis IE, Hashash JG, et al. Monocytosis is a biomarker of severity in inflammatory bowel disease: analysis of a 6-year prospective natural history registry. *Inflamm Bowel Dis.* 2022;28(1):70–8.
103. Kondo A, Ma S, Lee MY, Ortiz V, Traum D, Schug J, et al. Highly multiplexed image analysis of intestinal tissue sections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2021;161(6):1940–52.
104. Friedrich M, Pohin M, Jackson MA, Korsunsky I, Bullers SJ, Rue-Albrecht K, et al.; Oxford IBD Cohort Investigators; Roche Fibroblast Network Consortium. IL-1-driven stromal-neutrophil interactions define a subset of patients with inflammatory bowel disease that does not respond to therapies. *Nat Med.* 2021;27(11):1970–81.
105. Dai Z, Zhang J, Xu W, Du P, Wang Z, Liu Y. Single-cell sequencing-based validation of cell-associated diagnostic model genes and drug response in Crohn's disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7):6054.

106. Devlin JC, Axelrad J, Hine AM, Chang S, Sarkar S, Lin JD, et al. Single-cell transcriptional survey of ileal-anal pouch immune cells from ulcerative colitis patients. *Gastroenterology*. 2021;160(5):1679–93.
107. Chapuy L, Sarfati M. Single-cell protein and RNA expression analysis of mononuclear phagocytes in intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of ulcerative colitis and crohn's disease patients. *Cells*. 2020;9(4):813.
108. Kong L, Pokatayev V, Lefkovith A, Carter GT, Creasey EA, Krishna C, et al. The landscape of immune dysregulation in Crohn's disease revealed through single-cell transcriptomic profiling in the ileum and colon. *Immunity*. 2023;56(2):444–458.e5.
109. Martin JC, Chang C, Boschetti G, Ungaro R, Giri M, Grout JA, et al. Single-cell analysis of Crohn's disease lesions identifies a pathogenic cellular module associated with resistance to anti-TNF therapy. *Cell*. 2019;178(6):1493–1508.e20.
110. Mitsialis V, Wall S, Liu P, Ordovas-Montanes J, Parmet T, Vukovic M, et al.; Boston Children's Hospital Inflammatory Bowel Disease Center; Brigham and Women's Hospital Crohn's and Colitis Center. Single-cell analyses of colon and blood reveal distinct immune cell signatures of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2020;159(2):591–608.e10.
111. Fulkerson PC, Rothenberg ME. Chemokines, CXC | CXCL9 (MIG). In: Laurent GJ, Shapiro SD, editors. *Encyclopedia of respiratory medicine*. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 398–402.
112. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – a target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev*. 2018;63:40–7.
113. Elmentaite R, Ross AD, Roberts K, James KR, Ortmann D, Gomes T, et al. Single-cell sequencing of developing human gut reveals transcriptional links to childhood Crohn's disease. *Dev Cell*. 2020;55(6):771–783.e5.
114. Fawcner-Corbett D, Antanaviciute A, Parikh K, Jagielowicz M, Gerós AS, Gupta T, et al. Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution. *Cell*. 2021;184(3):810–826.e23.
115. Pathirana WG, Chubb SP, Gillett MJ, Vasikaran SD. Faecal calprotectin. *Clin Biochem Rev*. 2018;39(3):77–90.
116. Rosati E, Rios Martini G, Pogorelyy MV, Minervina AA, Degenhardt F, Wendorff M, et al. A novel unconventional T cell population enriched in Crohn's disease. *Gut*. 2022;71(11):2194–204.
117. Yokoi T, Murakami M, Kihara T, Seno S, Arase M, Wing JB, et al. Identification of a unique subset of tissue-resident memory CD4+ T cells in Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2023;120(1):e2204269120.
118. Garrido-Trigo A, Corraliza AM, Veny M, Dotti I, Melón-Ardanaz E, Rill A, et al. Macrophage and neutrophil heterogeneity at single-cell spatial resolution in human inflammatory bowel disease. *Nat Commun*. 2023;14(1):4506.
119. Fan H, Wang A, Wang Y, Sun Y, Han J, Chen W, et al. Innate lymphoid cells: regulators of gut barrier function and immune homeostasis. *J Immunol Res*. 2019;2019:2525984.
120. Parikh K, Antanaviciute A, Fawcner-Corbett D, Jagielowicz M, Aulicino A, Lagerholm C, et al. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature*. 2019;567(7746):49–55.
121. Zhou L, Zhou W, Joseph AM, Chu C, Putzel GG, Fang B, et al. Group 3 innate lymphoid cells produce the growth factor HB-EGF to protect the intestine from TNF-mediated inflammation. *Nat Immunol*. 2022;23(2):251–61.

122. Hanna BS, Wang G, Galván-Peña S, Mann AO, Ramirez RN, Muñoz-Rojas AR, et al. The gut microbiota promotes distal tissue regeneration via ROR γ ⁺ regulatory T cell emissaries. *Immunity*. 2023;56(4):829–846.e8.
123. Rana N, Privitera G, Kondolf HC, Bulek K, Lechuga S, Salvo C, et al. GSDMB is increased in IBD and regulates epithelial restitution/repair independent of pyroptosis. *Cell*. 2022;185(2):283–298.e17.
124. Shao F, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis. *J Mol Biol*. 2022;434(4):167461.
125. Booty LM, Bryant CE. Gasdermin D and beyond – gasdermin-mediated pyroptosis in bacterial infections. *J Mol Biol*. 2022;434(4):167409.
126. Spalinger MR, Sayoc-Becerra A, Santos AN, Shawki A, Canale V, Krishnan M, et al. PTPN2 regulates interactions between macrophages and intestinal epithelial cells to promote intestinal barrier function. *Gastroenterology*. 2020;159(5):1763–1777.e14.
127. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):6008.
128. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(8):477-89.

Abstract

Introduction: Collectively classified as inflammatory bowel diseases, they are conditions that affect the gastrointestinal system causing chronic inflammation, with Crohn's disease being one of these. Crohn's disease can affect any given part of the gastrointestinal system, from the mouth to the anus, and can progress to severe transmural inflammation involving the entire thickness of the intestinal wall. Symptoms such as bloody diarrhea, abdominal pain, weight loss, and susceptibility to tumor development are common. The immune system acts in the gastrointestinal system promoting tolerance against commensal and food antigens. Crohn's disease manifests itself due to a breakdown in the tolerance mechanism and the consequent development of exacerbated inflammatory responses. Despite the involvement of the immune system in the pathology, the etiology of these diseases remains largely unknown. **Purpose:** In order to identify which subpopulations of circulating monocytes may be determinant in the progression of chronicity of Crohn's disease. **Methods:** We utilized four scRNA-seq analysis databases and the Seurat pipeline to better understand the pathology and involvement of monocytes in the disease. **Results:** Our findings demonstrated similar altered pathways in both blood and tissue cells, however some tissue-specific genes were found. Circulating monocytes, both CD14 and CD16, showed changes in pathways related to chemokine signaling, response to bacterial stimuli, adaptive response signaling and cell death. In tissue, we identified changes in chemokine signaling pathways, response to bacterial products, signaling to dendritic cells and altered death pathways. **Conclusions:** Our data suggest a similarity between circulating and tissue monocytes, even though they have tissue-specific gene signatures. Ultimately, analysis of these four databases suggests a central role of CD14 and CD16 monocytes in tissue inflammation, inflammatory cell recruitment, and altered cell survival within the inflamed intestinal microenvironment.

Keywords: Digestive system; Myeloid cells; Inflammatory bowel diseases; Crohn disease

Apêndice

Apêndice 1. Figuras Suplementares

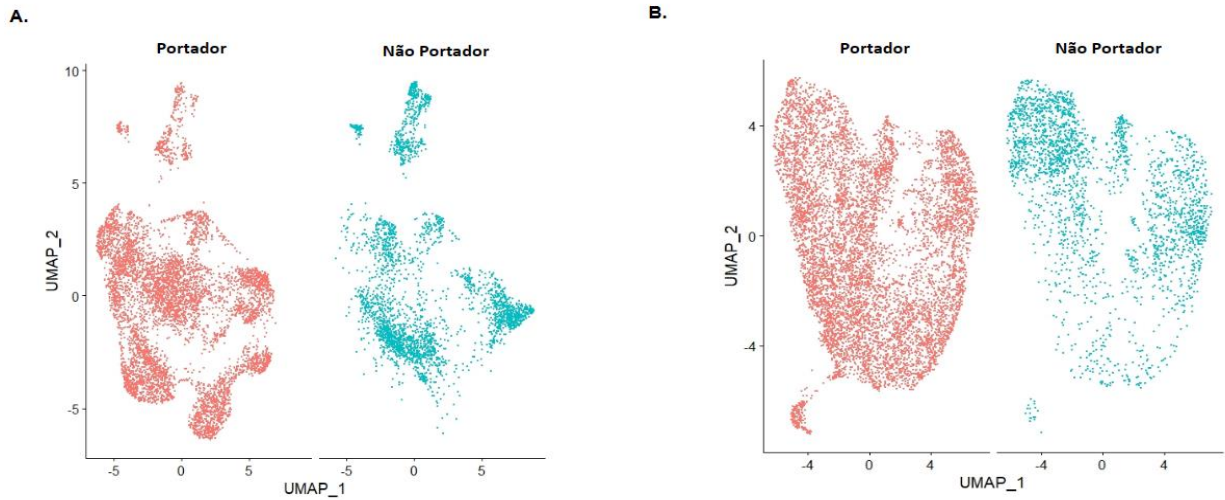


Figura Suplementar 1. A. UMAP dos monócitos circulantes divididos de acordo com o grupo a qual pertencem, indivíduos portadores ou não portadores da doença de Crohn, após integração dos *datasets*. B. UMAP dos monócitos do tecido intestinal divididos de acordo com o grupo a qual pertencem, indivíduos portadores ou não portadores da doença de Crohn, após integração dos *datasets*

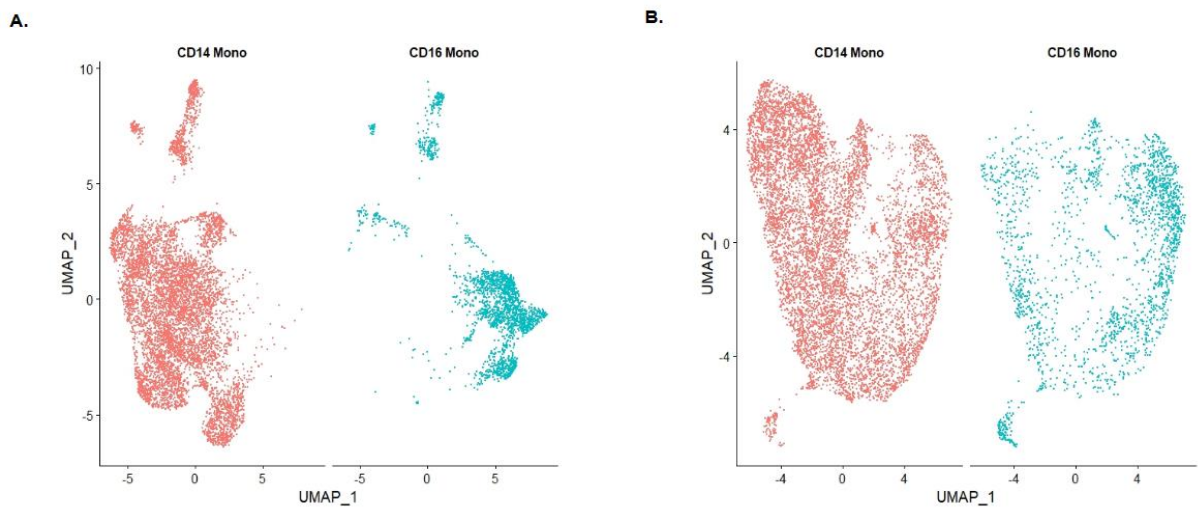


Figura Suplementar 2. A. UMAP dos monócitos circulantes divididos de acordo com a subpopulação CD14 ou CD16, após integração dos *datasets*. B. UMAP dos monócitos do tecido intestinal divididos de acordo com a subpopulação CD14 ou CD16, após integração dos *datasets*