



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN

**“CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS MIELOIDES
SUPRESORAS Y SU RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS
PACIENTES CON MIOPATÍAS INFLAMATORIAS”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
REUMATOLOGÍA

PRESENTA
DR. HÉCTOR ALEJANDRO CULEBRO BERMEJO

TUTOR DE TESIS
DR. JOSÉ JIRAM TORRES RUIZ

CO-TUTOR DE TESIS DRA. MARINA RULL GABAYET

Ciudad Universitaria Cd. Mx. 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	13
MÉTODOS.....	13
RESULTADOS	16
FIGURAS Y TABLAS	17
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26

RESUMEN

Introducción: Las miopatías inflamatorias idiopáticas (MII) son enfermedades autoinmunes sistémicas caracterizadas por miositis con frecuencia variable de afectación extramuscular. Dentro de la fisiopatología de la enfermedad, la respuesta inmune patogénica se encuentra dada principalmente por linfocitos T, B, macrófagos y células dendríticas; mientras que el papel de los neutrófilos y monocitos no ha sido completamente estudiado. Datos previos han demostrado que los pacientes con MII tienen aumento de los granulocitos de baja densidad. Estas células junto con los monocitos pueden ser patogénicas, pero de manera reciente también se ha demostrado que tienen función reguladora. A estas células se les conoce como mieloides supresoras (CMS) monocíticas (CMS-Mo) o neutrofílicas (CMS-Gr) y se han encontrado aumentadas en múltiples patologías incluyendo cáncer, infecciones y enfermedades autoinmunes. Hasta el momento se desconoce si la proporción de CMS es diferente en pacientes con MII en comparación con controles sanos. El objetivo de este estudio fue evaluar la proporción de CMS, su expresión de moléculas reguladoras como PD-L1 y ARG1 y su relación con las características clínicas de dichos pacientes.

Métodos: Se reclutaron a 22 pacientes con diagnóstico de MII y 14 controles sanos sin datos clínicos ni antecedentes familiares de enfermedad autoinmune. Los pacientes fueron evaluados para determinar la cantidad de actividad muscular y extramuscular así como el daño acumulado y discapacidad mediante el constructo IMACS. La proporción de CMS y su expresión de marcadores relacionados con regulación se evaluaron mediante citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó mediante U de Mann-Whitney para demostrar diferencias entre medianas independientes. Se usó el coeficiente de correlación de Spearman para evaluar correlación entre variables cuantitativas.

Resultados: Doce pacientes con MII fueron mujeres (54.5%). La mediana e intervalo intercuartil (IIC) de edad fue de 40 (26-42.5) años y los pacientes tuvieron un tiempo desde el diagnóstico de 6 (4.5-9.75) meses. El diagnóstico más frecuente fue la dermatomiositis (72.7%) y la mayoría de los pacientes tenían anticuerpos anti-Ro52 (36.4%), anti-MDA5 y anti-Mi2 (18.2% cada uno). En el momento de la evaluación, el 68.2% de los pacientes tomaban prednisona, 31.8% metotrexato, 9.1% azatioprina, 18.2% micofenolato de mofetilo y 31.8% hidroxicloroquina. Dieciséis pacientes (76.2%) presentaron manifestaciones cutáneas, el 47.6% tenía disfagia y el 23.8% tenía enfermedad pulmonar intersticial. Cinco controles sanos

eran mujeres (35.7%). La mediana de edad era de 27.5 (25-33) años. No hubo una diferencia estadísticamente significativa en la edad y el sexo de los grupos de estudio. La proporción de CMS-Gr fue mayor en pacientes con MII en comparación con controles sanos 0.73 con una mediana de (0.21-2.15) vs 0.12 % (0.02-0.31), $p < 0.007$), destacando también el mayor número de CMS-Gr inmaduras en pacientes con miopatía inflamatoria con una mediana de 89.6 (33-97.1) vs 30 (20.3-49) en controles sanos con $p = 0.0023$, mientras que las CMS-Gr maduras fueron menores en miopatías inflamatorias con mediana de 10.2 (2.9-67) vs 70.85 (52.2-79.7) en controles sanos con una $p = 0.0001$, en cuanto a la expresión de Arg1 por intensidad media de fluorescencia (IMF) en CMS-Gr se encontró una mediana de 5372 (3072-7214), comparado con 1758 (1089-4747) en controles sanos con una $p = 0.034$, mientras que en el porcentaje de CMS-Gr PDL1+ se encontró una mediana de 0.44 (0.12-0.65) en miopatías y en controles sanos 0.04 (0.004-0.25) con un valor de $p = 0.031$. El porcentaje de CMS-Mo fue mayor en MII con mediana de 1.11 (0.07-2.9) vs controles sanos 0.08 (0.01-1.27) con $p = 0.029$. La proporción de CMS-Mo Arg1+ fue de 0.52 (0.16-1.24) en MII y en controles sanos 0.01 (0.001-0.31) con $p = 0.07$. La IMF de arginasa-1 en CMS-Mo fue mayor en MII con mediana de 3507 (3339-5483) vs 1967 (1540-2849) con $p = 0.028$, el porcentaje de PDL1 en CMS-Mo en MII arrojó una mediana de 0.5 (0.14-1.7) y en controles sanos de 0.001 (0.0-0.01) con $p = 0.0008$. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de PD-L1 entre pacientes con MII y controles sanos. Además, las CMS mostraron correlación con diversos parámetros de actividad y daño.

Conclusiones: Los pacientes con MII tienen una mayor proporción de CMS-Gr con un fenotipo inmaduro y una expresión más alta de arginasa 1. De igual forma, las CMS-Mo se encuentran aumentadas en pacientes con MII. La proporción de CMS PD-L1+ fue mayor en pacientes con MII que en sujetos control. Existe correlación entre la proporción de CMS y los parámetros de actividad y daño de pacientes con MII. Se requieren más estudios para evaluar su capacidad supresora y su relación con otras características clínicas, incluida la presencia de neoplasia.

INTRODUCCIÓN

Las miopatías inflamatorias idiopáticas (MII) son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por debilidad muscular proximal, aumento de creatina fosfoquinasa, hallazgos miopáticos en la electromiografía e infiltrado inflamatorio en la biopsia de músculo(1). Incluidas en el espectro de las miopatías inflamatorias idiopáticas se encuentran la dermatomiositis (DM), polimiositis (2), miopatía necrosante inmunomediada (3) y síndrome anti - sintetasa (SA) (1).

La fisiopatología de dichas enfermedades es compleja e incluye múltiples alteraciones en el sistema innato y adaptativo. Con respecto al sistema inmune innato, en el músculo, las células mieloides juegan un papel fundamental en el daño a membranas de miocitos, en donde aparentemente los diferentes ciclos de isquemia y reperfusión promueven la liberación de radicales libres de oxígeno y la invasión de macrófagos y neutrófilos con el consecuente daño de la membrana(4). Asimismo, los neutrófilos destruyen miocitos en co-cultivo (4) y los macrófagos provenientes de monocitos, infiltran frecuentemente el músculo en pacientes con miopatías (5), por lo que las células mieloides aparentemente juegan un papel importante en la fisiopatogénia de las MII.

Dentro de las subpoblaciones de células mieloides, recientemente se ha descrito un subtipo con función inmunosupresora en sangre periférica en pacientes con cáncer, infecciones y enfermedades autoinmunes, conocidas como células mieloides supresoras (CMS) (6). Dichas células son el resultado del aumento en la hematopoyesis y tienen un fenotipo inmaduro. Para mantener el fenotipo inmaduro, las CMS dependen de varios estímulos entre los que se encuentran VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), trauma, IL-1 β (Interleucina 1 Beta)(7), COX-2 (Ciclooxigenasa 2), Prostaglandinas, IL-6 (Interleucina 6), IFN- γ (Interferón gamma) y TGF- β (factor de crecimiento transformante beta); mientras que TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) favorece la acumulación y supervivencia de dichas células en sangre periférica (8), y las proteínas S100A8 y S100A9 han demostrado ser las principales quimioatrayentes de células mieloides supresoras hacia tumores (9).

Se han descrito 2 fenotipos principales de células mieloides supresoras, las similares a neutrófilos o granulocíticas (CMS-Gr) y a monocitos (CMS-Mo). Las primeras se caracterizan por la expresión de CD33dim, CD11b+, CD15+ ó CD66b+, y utilizan principalmente especies reactivas de oxígeno (ERO) como el mecanismo de supresión inmune, mientras que las monocíticas expresan CD33+, CD11b+, CD14+ y HLA-DR- (10) y utilizan principalmente óxido nítrico, la depleción de aminoácidos por arginasa-1 (ARG-1), la depleción de L-triptofano y de L-cisteína y una variedad de citocinas supresoras inmunitarias para suprimir diversas funciones inmunes (11). Globalmente, las CMS usan los siguientes mecanismos de supresión:

El primer tipo de mecanismo es el agotamiento de los nutrientes requeridos por los linfocitos específicamente, el agotamiento de la L-arginina mediante la acción de ARG-1. El agotamiento de estos aminoácidos provoca la disminución de la cadena ζ en el receptor de la célula T (TCR) inhibiendo la función de las células T activadas por antígeno (12).

El segundo tipo de mecanismo es la generación de estrés oxidativo, que es causada por la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno por CMS. El peroxinitrito y peróxido de hidrógeno son producidos por las actividades combinadas y de cooperación de NADPH oxidasa, ARG1 e iNOS en diferentes subconjuntos de CMS, y estas especies reactivas promueven la pérdida de la cadena ζ de TCR y la interferencia con el receptor de IL-2 (12).

El tercer tipo de mecanismo interfiere con el tráfico de linfocitos y la viabilidad. La expresión de ADAM17 en la membrana plasmática de las CMS disminuye la expresión CD62 en la superficie de las células CD4+ y T CD8+ vírgenes, limitando de este modo la recirculación de las células T a los ganglios linfáticos. Otro ejemplo es la modificación de CCL2 por el peroxinitrito derivado de CMS, un proceso que altera la migración de las células T CD8+ efectoras al núcleo del tumor. Además, las CMS expresan galectina 9 que induce la apoptosis de las células T. Las CMS también disminuyen el número de células NK humanas, principalmente a través de mecanismos dependientes del

contacto de la membrana y a través de la interacción con el receptor de células NK NKp30 (también conocido como NCR3) (12).

El cuarto tipo de mecanismo es la activación y expansión de células T Regulatoras (Treg). Las CMS promueven la expansión clonal de células Treg y también inducen la conversión de las células T CD4+ vírgenes a células Treg. Los mecanismos no se entienden completamente, pero pueden implicar el contacto de célula a célula (incluyendo las interacciones CD40-CD40L), la producción de factores solubles (tales como IFN, IL-10 y TGF) por las CMS y, posiblemente, también la expresión de ARG1 por las CMS (12). Finalmente se ha demostrado que las células mieloides supresoras también son capaces de favorecer la producción de IL-10 (Interleucina-10) por parte de células B en el modelo animal de lupus Roquin^{san/san} (13).

La expansión y la activación de las CMS

La expansión y la activación de las CMS están influenciadas por varios factores diferentes, que se pueden dividir en dos grupos principales (12). El primer grupo incluye factores que se producen primordialmente por las células tumorales, que promueven la expansión de las CMS a través de la estimulación de mielopoyesis e inhibición de la diferenciación de las células mieloides maduras. El segundo grupo de factores se produce principalmente por células T activadas y las células del estroma del tumor, y está implicado en la activación de CMS directamente (12).

Mecanismos de expansión de las CMS.

Los factores que inducen la expansión de las CMS incluyen la ciclooxygenasa 2, prostaglandinas, factor de células madre, IL-6, granulocitos / macrófagos y factor de crecimiento endotelial vascular (13). La mayoría de estos factores desencadenan vías de señalización en las CMS que convergen en Janus quinasa (JAK), miembros de la familia de proteínas y transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3), que son moléculas que están implicadas en la supervivencia celular, proliferación, diferenciación y apoptosis (12).

Las CMS en ratones portadores de tumores tienen un aumento notable en los niveles de STAT3 fosforilado en comparación con células mieloides de ratones sanos. La exposición de células progenitoras hematopoyéticas al sobrenadante de cultivos de células del tumor resultó en la activación de JAK2 y STAT3, y se asoció con una expansión de CMS *in vitro*. La activación de STAT3 se asocia con aumento de la supervivencia y proliferación de células progenitoras mieloides, probablemente a través de la regulación positiva de la expresión de Bcl6, ciclina D1, MYC y survivina. Así mismo, la activación anormal y persistente de STAT3 en células progenitoras mieloides previene su diferenciación en células mieloides maduras y con ello promueve la expansión de CMS (12).

Los resultados recientes sugieren que la STAT3 regula también la expansión de CMS mediante la inducción de la expresión de proteínas de unión a calcio. S100A8 y S100A9 pertenecen a la familia de proteínas de unión a calcio. La regulación positiva de STAT3 es dependiente de la expresión de S100A8 y S100A9 por las células progenitoras mieloides, impide su diferenciación y resulta en la expansión de las CMS en los bazo de ratones transgénicos portadores de tumor que sobreexpresa S100A9. Por el contrario, las CMS no se expanden en la sangre periférica y bazo de ratones deficientes para S100A9 (12).

Mecanismos de activación de las CMS.

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la actividad supresora de las CMS requiere no sólo de factores que promueven su expansión, sino también de factores que inducen su activación. La expresión de estos factores, que son producidos principalmente por células T activadas y células estromales tumorales, es inducida por diferentes productos bacterianos y virales, o como resultado de la muerte de células tumorales. Estos factores, que incluyen IFN, ligandos para receptores de tipo Toll (TLRs), IL-4, IL-13 y factor de crecimiento transformante- β , activan varias vías diferentes de señalización en las CMS que implican STAT6, STAT1 y el factor nuclear-kB (14). La activación de la ruta de señalización de IL-4 en las CMS recién aisladas induce la expresión de la ARG-1. Además, IL-4 e IL-13 regulan a la alza la actividad de la ARG-1, lo que aumenta la función supresora de las CMS (14). En línea con estas observaciones, otros experimentos han demostrado que la deficiencia de STAT6 bloquea la producción de la arginasa-1 por CMS. Por otra parte, también se encontró que

la vía de IL-4-STAT6 está involucrada en la producción de IL-13 inducida por factor de crecimiento transformante Beta en CMS de ratones con sarcoma, lo que resulta en una disminución de inmunovigilancia del tumor. Estas observaciones indican que la activación de CMS es una acción básica de la respuesta inmune innata del huésped a los patógenos que expresan ligandos de receptores de tipo Toll (14).

Relación entre las CMS y diversas patologías

Las células mieloides supresoras se han encontrado expandidas principalmente en pacientes con cáncer, así como en múltiples modelos de enfermedad autoinmune incluyendo esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, uveoretinitis, alopecia areata, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide y lupus eritematoso generalizado, entre otras (15).

- CMS en trastornos autoinmunes

En enfermedades autoinmunes, resultados paradójicos han demostrado que las células mieloides supresoras pueden ser inmunosupresoras o patogénicas dependiendo del modelo de estudio y del ambiente en el que se encuentren. De igual forma, en un modelo animal humanizado de lupus en donde se inyectaron células mononucleares de sangre periférica a un ratón inmunodeficiente, se observó que cuando se retiraban las células mieloides supresoras había una disminución de la gravedad de la nefritis y de la cantidad de IL-17A (Interleucina 17-A) en bazo y riñón (17). En el modelo animal de lupus (NZB X NZW)F1, se observa disminución de la función de las células mieloides supresoras granulocíticas ya que estas favorecieron la proliferación de células T, mientras que las células mieloides supresoras monocíticas la disminuyeron (18). En pacientes con lupus de reciente diagnóstico, las células mieloides supresoras monocíticas se encuentran aumentadas, correlacionando con la actividad de la enfermedad y disminuyen después del tratamiento (19). En contraste, en el modelo animal Roquin^{san/san}, la infusión de células mieloides supresoras demostró disminuir la infiltración de linfocitos en órganos linfoides y riñón y disminuyó la cantidad de inmunoglobulinas y de células Th1, Th17 (13).

En artritis reumatoide en 11 pacientes sometidos a artrocentesis (20), aproximadamente 85% de las células en la articulación tenían fenotipo de células mieloides supresoras, 95% granulocíticas (20).

Cuando dichas células se pusieron en contacto con células T autólogas, hubo disminución de la proliferación de células T (20). En modelos animales de artritis inducida por colágena, las células mieloides supresoras se acumulan en el bazo de los ratones desde el día 20 de la inducción de artritis e inhiben la proliferación de células T autólogas cuando se ponen en relación 1:1 ó 1:4 (16). Además, las células mieloides supresoras fueron capaces de suprimir la secreción de citocinas por linfocitos T incluyendo IFN- γ (interferón gamma), IL-2 (Interleucina 2), TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa) e IL-6 (Interleucina-6), mientras que aumentaron los niveles de IL-10 (Interleucina-10) y los de IL-4 (Interleucina-4) permanecieron inalterados (16). En este estudio, las células mieloides supresoras disminuyeron la cantidad de Th17 (13) y la eliminación de estas impide la mejoría que normalmente ocurre espontáneamente en este modelo (16).

En otros modelos animales de artritis inducida por colágena se observó disminución de la proliferación de CD4 al ser incubados con células mieloides supresoras monocíticas (21). El mecanismo es dependiente de IFN- γ (interferón gamma) secretado por células T activadas que inducen la síntesis de óxido nítrico por parte de las células mieloides supresoras y por lo tanto disminución de la proliferación de células T (21). De igual forma en presencia de CMS, las células B disminuyeron su proliferación y la producción de IgG (Inmunoglobulina G) e IgM (Inmunoglobulina M), con un mecanismo dependiente de óxido nítrico y prostaglandina E₂ (20). En contraste con estos datos, en presencia de RANKL (Receptor de factor activador nuclear Kappa B ligando), las CMS se pueden diferenciar a osteoclastos y favorecer las erosiones en modelos animales de artritis reumatoide (22). De igual forma, otros estudios han demostrado que en modelos animales de artritis las células mieloides supresoras son capaces de inducir un fenotipo Th17 y por lo tanto ser patogénicas (23).

De igual forma, en contraste con su efecto inmunosupresor, las células mieloides supresoras en sangre periférica correlacionaron con el grado de inflamación de glándulas salivales y la transferencia de células mieloides supresoras a un modelo animal de síndrome de Sjögren empeoró las características clínicas (25).

Dentro de las moléculas reguladoras asociadas a CMS se encuentran PD-L1, cuya expresión se ha observado aumentada en MII y es importante en el control de la activación de las células T. El balance de la inmunidad mediada por las células T es determinante en el control de enfermedades infecciosas y cáncer y en el desarrollo de tolerancia inmunológica a los antígenos propios. La inducción y mantenimiento de la tolerancia mediada por células T a través de la vía PD-1/PDL limita la respuesta de subpoblaciones de células T efectoras para evitar daño tisular como resultado de una mayor actividad de la inmunidad.

En resumen, aunque las CMS se describieron originalmente en el contexto de células tumorales en ratones y pacientes con cáncer, en los últimos años se ha estudiado que participan en múltiples respuestas inflamatorias, tales como infecciones y más recientemente en autoinmunidad. No obstante, la proporción de CMS y su expresión de moléculas relacionadas con regulación como ARG1 y PD-L1 nunca se ha estudiado en MII.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fisiopatogenia de las MII no es completamente conocida. A pesar de que existe evidencia en modelos animales y en biopsias musculares de pacientes con MII de la participación de células de origen mieloides en la inflamación patogénica en dichas enfermedades, nunca se ha determinado si las células mieloides supresoras se encuentran aumentadas en pacientes con MII y si tienen características inmunofenotípicas diferentes en comparación con sujetos sanos.

JUSTIFICACIÓN

Encontrar un aumento en las células mieloides supresoras en pacientes con MII y observar si correlacionan con actividad de la enfermedad contribuirá al conocimiento del papel de las células mieloides en la fisiopatogenia de pacientes con miopatía.

HIPÓTESIS

Pregunta de investigación:

¿La proporción de células mieloides supresoras en sangre periférica será diferente en pacientes con miopatías inflamatorias en comparación con sujetos control?

Hipótesis:

Los pacientes con miopatías inflamatorias Idiopáticas tendrán el doble de células mieloides supresoras en sangre periférica en comparación con sujetos control.

OBJETIVOS

Objetivo principal.

Evaluar la proporción de CMS en sangre periférica de pacientes con MII y sujetos control.

Objetivos Específicos.

1. Realizar una caracterización inmunofenotípica de las CMS en pacientes con miopatía inflamatoria idiopática incluyendo su expresión de PD-L1 y arginasa 1.
2. Cuantificar la proporción de CMS en pacientes con miopatía inflamatoria idiopática y su relación con actividad de la enfermedad.

Objetivos secundarios.

1. Evaluar la actividad muscular de los pacientes con miopatías inflamatorias mediante EVA (Escala visual análoga) del paciente y médico, HAQ (Cuestionario de capacidad funcional), MMT8 (Evaluación manual de 8 grupos musculares) (26), MYOACT (Escala de evaluación de actividad de la miositis en la enfermedad) (27) y MITAX (Índice de actividad de miositis por intención a tratar) (26)
2. Evaluar la actividad cutánea de los pacientes con dermatomiositis mediante la escala CDASI (Evaluación de actividad cutánea de la enfermedad).
3. Evaluar el daño acumulado y discapacidad mediante MDI

PACIENTES Y MÉTODOS.

Este fue un estudio de casos y controles se reclutaron 22 pacientes con diagnóstico de MII de acuerdo con los criterios de Bohan y Peter y/o ACR EULAR o Sontheimer y Connor según correspondiera (28,29) y de acuerdo con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Grupo de estudio: Pacientes mayores de 18 años, con diagnóstico de miopatías inflamatorias idiopáticas con cualquier grado de actividad de la enfermedad y tiempo de evolución de la misma con o sin tratamiento inmunosupresor y que consientan la toma de una muestra de sangre periférica.
- Grupo control: Hombres y mujeres mayores de 18 años sin antecedentes familiares o personales de enfermedades autoinmunes. Además, que no tengan diagnóstico de cáncer o infecciones de cualquier tipo, embarazo o puerperio en las últimas dos semanas y, por lo tanto se diagnostiquen como clínicamente sanos por un médico internista o reumatólogo.

Criterios de exclusión

Grupo de estudio:

- Pacientes con diagnóstico de otra enfermedad del tejido conectivo o autoinflamatoria.
- Embarazo o puerperio.
- Infecciones agudas o crónicas de cualquier tipo en las últimas dos semanas.
- Pacientes que no otorguen consentimiento informado para la toma de muestra de sangre periférica.

Grupo control:

- Diagnóstico de cáncer
- Infecciones de cualquier tipo en las últimas dos semanas incluyendo virales crónicas
- Embarazo o puerperio en las últimas dos semanas
- Sujetos que no otorguen consentimiento informado para la toma de muestra de sangre periférica.

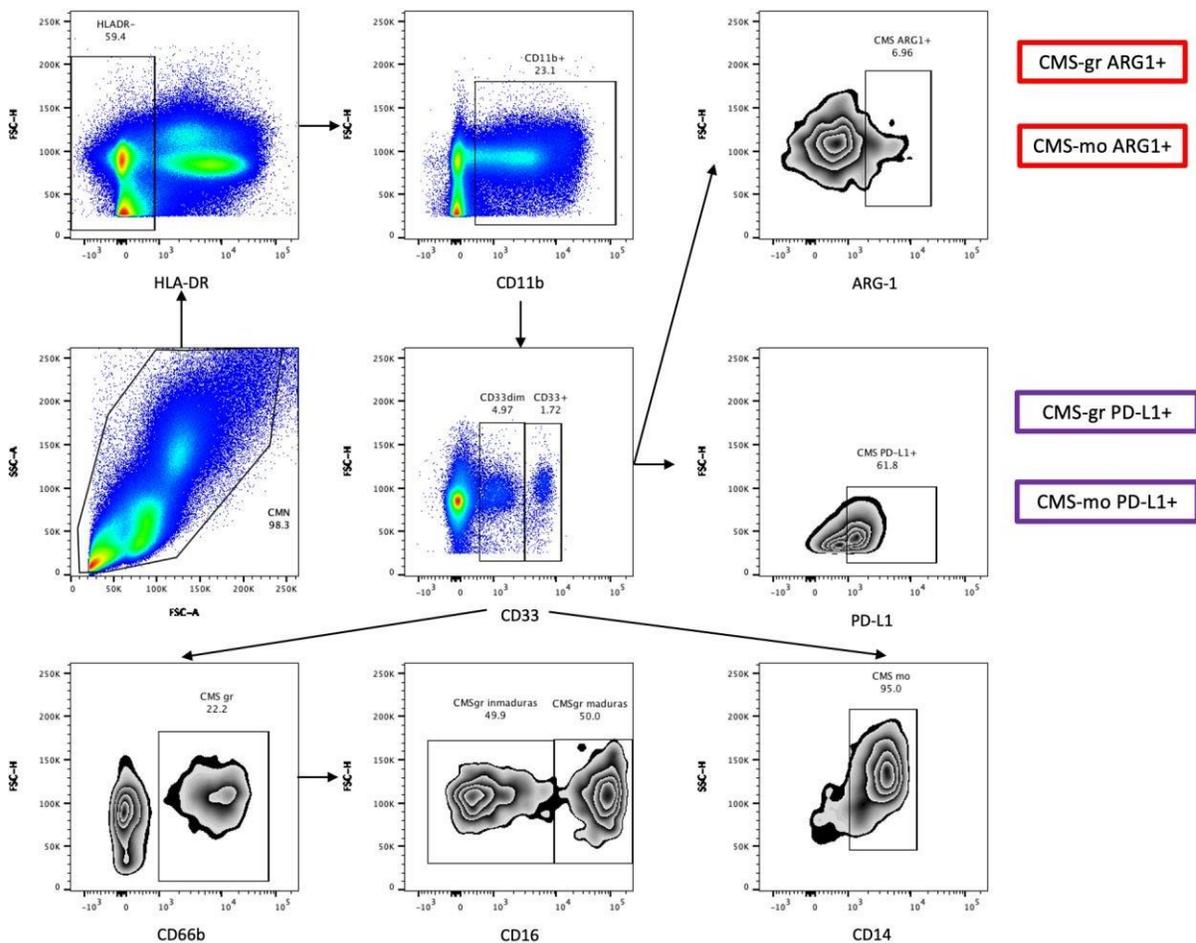
Criterios de eliminación

- Pacientes en quienes la información no sea completa para la realización del análisis.

Los sujetos se evaluaron clínicamente para determinar los parámetros de actividad y daño acumulado a nivel muscular y extramuscular mediante los parámetros del consorcio IMACS. Además, se les llevó a cabo una capilaroscopia del lecho ungueal con un capilaroscopio 500X y del

expediente clínico se recabaron los parámetros pulmonares. Posteriormente, se tomó una muestra de sangre periférica para separar células mononucleares por gradientes de densidad con Ficoll y se marcaron con anticuerpos acoplados a fluorocromo. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo LSR Fortessa de 4 láseres y se catalogaron como CMS-gr aquellas CD33dim, CD14-, CD15+, CD16- (inmaduras) y CD16+ (maduras) o monocíticas (CD33+, CD11b+, CD14+, HLA-DR-). De igual forma se evaluó la proporción de CMS positivas para arginasa 1 y PDL1 y su expresión de dichas moléculas mediante la intensidad media de fluorescencia. Dicho procedimiento se llevó a cabo de igual forma en 14 controles sanos ajustados por edad y género. Las muestras se analizaron con el software Flow-Jo y la estrategia de gating se muestra en la figura 1.

Figura 1. Estrategia de gating para la evaluación de la proporción de CMS y su expresión de ARG1 y PD-L1



Se compararon las proporciones de CMS y su expresión de las moléculas de interés mediante U de Mann Whitney. Posteriormente, se evaluó si el porcentaje de células mieloides supresoras correlaciona con las características clínicas de pacientes con miopatías mediante Rho de Spearman. Se tomó un valor de $p \leq 0.05$ y el análisis se llevó a cabo con la ayuda del software SPSS v21.

RESULTADOS

Doce pacientes con MII fueron mujeres (54,5%). La mediana de edad fue de 40 (26-42.5) años y los pacientes tuvieron un tiempo desde el diagnóstico de 6 (4.5-9.75) meses. El diagnóstico más frecuente fue la dermatomiositis (72.7%) y la mayoría de los pacientes tenían anticuerpos anti-Ro52 (36.4%), anti-MDA5 y anti-Mi2 (18.2% cada uno). En el momento de la evaluación, el 68.2% de los pacientes tomaban prednisona, 31.8% metotrexato, 9.1% azatioprina, 18.2% mofetil micofenolato y 31.8% de hidroxicloroquina.

En la tabla 1, se muestran las características demográficas, los diagnósticos, manifestaciones clínicas, anticuerpos de MII y tratamiento inmunosupresor de pacientes y controles sanos. Dieciséis pacientes (76.2%) presentaron manifestaciones cutáneas, el 47.6% tuvieron disfagia y el 23.8% tuvieron enfermedad pulmonar intersticial.

FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Características demográficas, diagnósticos, manifestaciones clínicas, anticuerpos de MII y tratamiento inmunosupresor de pacientes con MII y controles sanos.

Variable	MI I N=22 Mediana (IIC)	Control sano N=14 Mediana (IIC)	P
Mujer (%)	12 (54.5)	5 (35.7)	0.2
Edad en años	27.5 (25-33)	40 (26.00-42.50)	0.18
Diagnóstico			
Dermatomiositis (%)	16 (72.7)		
Síndrome anti-sintetasa	3 (13.6)		
Síndrome de sobreposición(%)	2 (9.1)		
Miopatía necrosante(%)	1 (4.5)		
Uso de inmunosupresores			
Uso de prednisona (%)	15 (68.2)		
Dosis de prednisona (mg)	30 (15-60)		
Uso de metotrexate (%)	7 (31.8)		
Dosis de metotrexate (mg)	15 (15-17.5)		
Uso de azatioprina (%)	2 (9.1)		
Dosis de azatioprina (mg)	75 (50-100)		
Uso de mofetil micofenolato(%)	4 (18.2)		
Dosis de mofetil micofenolato (gr)	2 (1.25-2.75)		
Uso de hidroxicloroquina (%)	7 (31.8)		
Dosis de hidroxicloroquina (mg)	200 (200-200)		
Capilaroscopia anormal (%)	17 (77.3)		
Capilares dilatados (%)	12 (54.5)		
Mega capilares (%)	5 (13.9)		
Pérdida de capilares (%)	15 (68.2)		
Hemorragias (%)	8 (36.4)		
Neovasos (%)	2 (9.1)		
Ramificaciones (%)	7 (31.8)		
Trombosis (%)	3 (13.6)		
Calcinosis (%)	2 (9.1)		
Manifestaciones cutáneas (%)	16 (76.2)		
Disfagia (%)	10 (47.6)		
Ulceras (%)	3 (13.6)		
Enfermedad pulmonar intersticial (%)	5 (23.8)		
NINE	4 (80)		
NOC	1 (20)		
Anticuerpos			
Jo1	2 (9.1)		
PL12	1 (4.5)		
Mi2	4 (18.2)		
SRP	1 (4.5)		
MDA5	4 (18.2)		
NXP2	1 (4.5)		
TIF1 gamma	3 (13.6)		
Ro52	8 (36.4)		
PM/Sci75	1 (4.5)		
Ku	2 (9.1)		
SAE	1 (4.5)		
Tiempo de evolución en meses	6 (4.5-9.75)		

Cinco controles sanos eran mujeres (35,7%). La mediana de edad fue de 27.5 (25-33) años. No hubo una diferencia estadísticamente significativa en la edad y el sexo de los grupos de estudio. En la tabla 2, se muestran los parámetros de laboratorio de pacientes con MII.

Tabla 2. Parámetros de laboratorio de pacientes con MII.

Variable	MII N=22 Mediana (IIC)
Leucocitos totales (10 ³ µl)	7.4 (4.1-10.5)
Linfocitos totales (10 ³ µl)	899 (481-1353)
Neutrófilos totales (10 ³ µl)	5534 (3117-9044)
Neutrofilos/linfocitos	4.8 (2.56-8.18)
Monocitos totales (10 ³ µl)	391 (254-728)
Hemoglobina (gr/dl)	13.9 (11.6-15.12)
Creatinina (mg)	0.59 (0.43-0.74)
BUN (mg/dl)	12.4 (10.4-13.7)
CPK (Creatina-fosfoquinasa) (U/L)	155 (77-3645)
DHL (Deshidrogenasa láctica) (U/L)	378 (248-672)
Aldolasa (U/L)	7.8 (4.7-14.8)
ALT (Alanina transaminasa) U/L	64 (27-161)
AST(Aspartato aminotransferasa) U/L	95 (38-245)
Albumina (g/dl)	3.6 (3.3-4.0)
Globulinas (g/dl)	3.3 (2.9-3.8)
C3 (Complemento C3) mg/dl	119 (101-132)
C4 (Complemento C4) mg/dl	26 (21.5-33.2)
PCR (Proteína C Reactiva) (mg/L)	0.34 (0.22-3.5)
VSG (Velocidad de sedimentación globular) (mm/hr)	12 (7-24)

En la tabla 3 se muestran los parámetros de actividad de la enfermedad, daño acumulado y discapacidad de los pacientes con MII.

Tabla 3. Parámetros de actividad y daño en pacientes con MII.

Variable	MII N=22 Mediana (IIC)		MII N=22 Mediana (IIC)
Prueba muscular manual-8 (MMT-8)	123 (97-143)	Escala visual análoga (EVA gastrointestinal)	5 (0-10)
Escala visual análoga (EVA médico)	7 (5-10)	Escala visual análoga (EVA cardiovascular)	0 (0-10)
Escala visual análoga (EVA paciente)	8 (6.75-10)	Escala visual análoga (EVA pulmonar)	0 (0-4)
Daño cutáneo activo	3.5 (0-14.75)	Escala visual análoga (EVA extramuscular)	4.5 (0-7.25)
Daño cutáneo crónico	0.5 (0-10)	Escala visual análoga (EVA muscular)	5 (0.75-7.75)
Escala visual análoga (EVA constitucional)	5.5 (0-10)	Escala visual análoga (EVA global)	7 (5-8.25)
Escala visual análoga (EVA cutáneo)	3 (0-6)	Cuestionario de capacidad funcional (HAQ)	2 (0-2.8)

Variable	Mediana (min-max)	Variable	Mediana (min-max)
Daño muscular EVA	0 (0-2)	Daño endócrino EVA	0 (0-1)
Daño muscular suma	0 (0-1)	Daño endócrino suma	0 (0-1)
Daño esquelético EVA	0 (0-1)	Daño infección EVA	0 (0-1)
Daño esquelético suma	0 (0-1)	Daño infección suma	0 (0-1)
Daño cutáneo EVA	0 (0-3)	Daño malignidad EVA	0 (0-1)
Daño cutáneo suma	0 (0-1)	Daño malignidad suma	0 (0-1)
Daño gastrointestinal EVA	0 (0-1)	Daño otro EVA	0 (0-1)
Daño gastrointestinal suma	0 (0-1)	Daño otro suma	0 (0-1)
Daño pulmonar EVA	0 (0-10)	Daño global EVA	0 (0-1)
Daño pulmonar suma	0 (0-2)	Extensión del daño	0 (0-0.08)
Daño cardiovascular EVA	0 (0-1)	Gravedad del daño	0 (0-0.1)
Daño cardiovascular suma	0 (0-1)	Daño extendido	0 (0-2)
Daño vascular EVA	0 (0-1)	HAQ	2 (0-3)
Daño vascular suma	0 (0-1)		

En la figura 2-4 y tabla 4 se muestran las proporciones de CMS-Gr maduras e inmaduras, CMS-Mo y su respectiva expresión de arginasa-1 y PD-L1 en sujetos control y pacientes con MII. Como se observa, la proporción de CMS de ambos tipos y la expresión de arginasa-1 y PD-L1 fue mayor en pacientes con MII en comparación con sujetos control.

Tabla 4. Proporción de CMS y de su expresión de arginasa-1 y PD-L1 en pacientes con MII y controles sanos.

Variable	MI I N=22 Mediana (IIC)	Control sano N=14 Mediana (IIC)	P
% de CMS-Gr	0.73 (0.21-2.15)	0.12 (0.02-0.31)	<0.007
% de CMS-Gr inmaduras	89.6 (33-97.1)	30 (20.3-49)	0.0023
% de CMS-Gr maduras	10.2 (2.9-67.00)	70.85 (52.2-79.7)	0.0001
% de Arg1+ CMS-Gr	0.56 (0.30-3.35)	0.01 (0.002-0.06)	0.0043
Intensidad media de fluorescencia de Arg1 en CMS-Gr	5372 (3072-7214)	1758 (1089-4747)	0.034
% de PDL1+ CMS-Gr	0.44 (0.12-0.65)	0.04 (0.004-0.25)	0.031
Intensidad media de fluorescencia de PD-L1+ en CMS-Gr	3259 (2002-3858)	1659 (1570-4289)	0.31
% de CMS-Mo	1.11 (0.07-2.9)	0.08 (0.01-1.27)	0.029
% de Arg1+ CMS-Mo	0.52 (0.16-1.24)	0.01 (0.001-0.31)	0.07
Intensidad media de fluorescencia de Arg1 en CMS-Mo	3507 (3339-5483)	1967 (1540-2849)	0.028
% de PDL1+ CMS-Mo	0.5 (0.14-1.7)	0.001 (0.000-0.01)	0.0008
Intensidad media de fluorescencia de PD-L1+ en CMS-Mo	2585 (1954-10393)	6295 (3437-36593)	0.15

Figura 2. Proporción de CMS-gr maduras e inmaduras

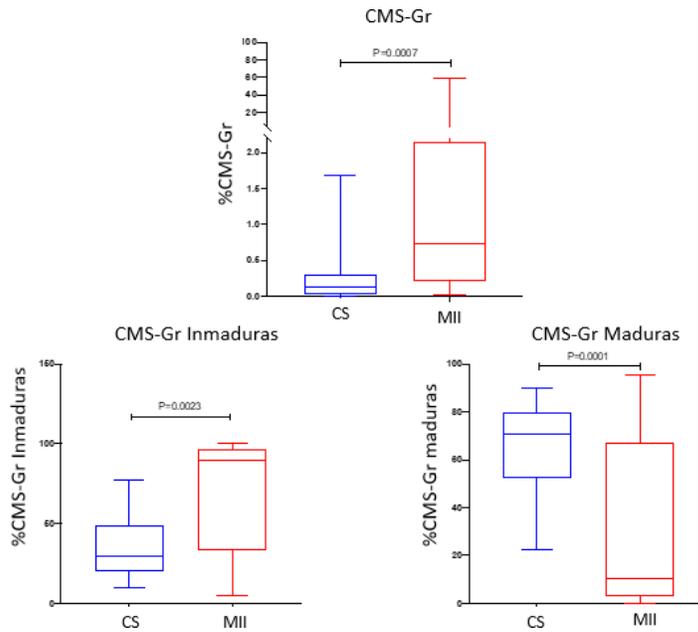


Figura 3. Expresión de ARG1 y PD-L1 en CMS-gr

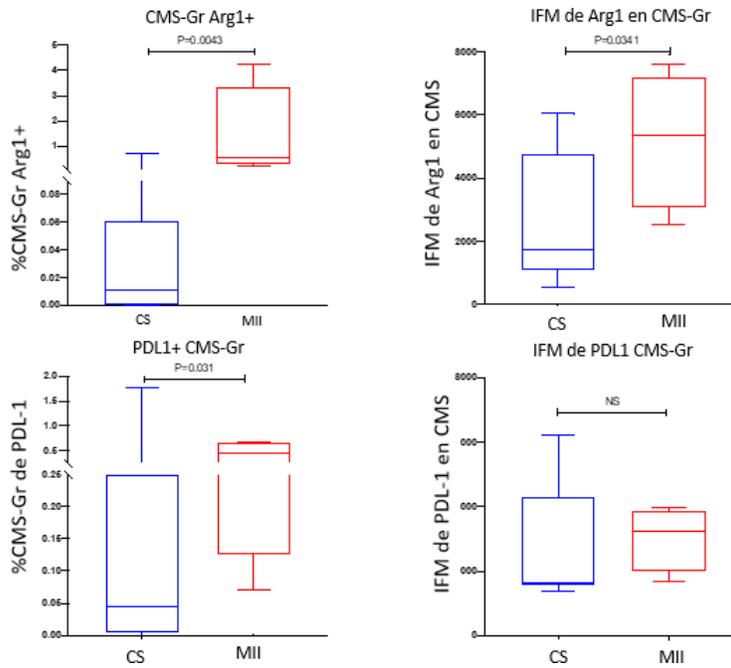
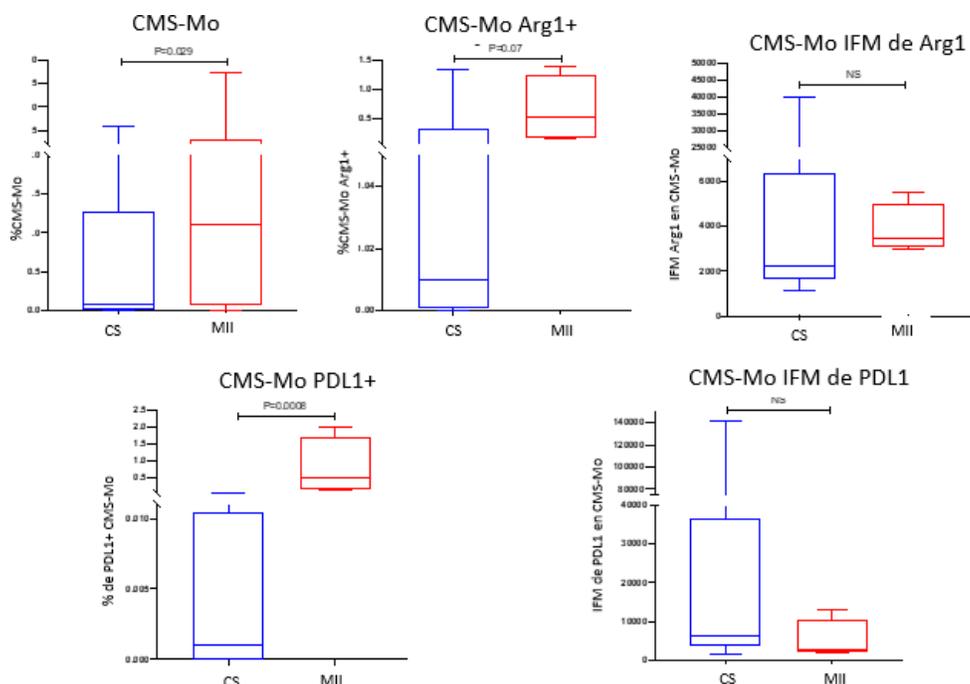


Figura 4. Proporción de CMS-Mo y su expresión de ARG1 y PD-L1



En la tabla 6 se muestran las correlaciones entre los parámetros de actividad y daño y la proporción de células mieloides supresoras, no hubo correlación entre las CMS y la terapia inmunosupresora ni en la expresión de arginasa-1 y PDL-1.

Tabla 6. Variables con correlación significativa con CMS.

Variable	CMS-Gr	CMS-Gr Inmaduras	CMS-Gr maduras	CMS-Mo
EVA Extramuscular	R=0.673, P=0.016			
EVA Global	R=0.636, P=0.026			
Daño cutáneo EVA	R=0.605, P=0.029			
Daño cutáneo suma	R=0.613, P=0.026			R=0.522, P=0.067
Daño infección EVA	R=0.694, P=0.009			R=0.514, P=0.072
Daño Infección Suma	R=0.812, P=0.008			R=0.674, P=0.047
Daño EVA muscular	R=0.542, P=0.056	R=0.438, P=0.041	R=-0.438, P=0.041	R=0.606, P=0.084
Daño esquelético EVA		R=0.446, P=0.038	R=-0.446, P=0.038	
Daño esquelético suma		R=0.455, P=0.034	R=-0.475, P=0.034	
Daño cutáneo activo			R=0.585, P=0.046	
Hemoglobina				R=-0.587, P=0.27
Albúmina	R=0.761, P=0.072			R=0.484, P=0.026
Gravedad del daño	R=0.606, P=0.084			R=0.681, P=0.043

En la tabla 7, se muestran las correlaciones que mostraron una tendencia a la significancia estadística

Tabla 7. Correlaciones con tendencia a la significancia estadística entre parámetros de actividad y daño y la proporción de CMS.

Variable	CMS-Gr	CMS-Gr Inmaduras	CMS-Gr maduras	CMS-Mo
Albúmina	R=0.761, P=0.072			R=0.484, P=0.026
AST (Aspartato aminotransferasa)	R=0.403, P=0.063			
MITAX constitucional	R=0.562, P=0.072			
MITAX cutáneo	R=0.504, P=0.095			
Daño muscular EVA	R=0.542, P=0.056			R=0.606, P=0.084
Daño muscular Suma	R=0.550, P=0.051			R=0.633, P=0.068
Gravedad de daño	R=0.606, P=0.084			R=0.681, P=0.043
CPK (Creatina-fosfoquinasa)		R=0.771, P=0.072	R=-0.761, P=0.072	
DHL (Deshidrogenasa láctica)		R=0.476, P=0.062	R=-0.476, P=0.072	
Cutáneo crónico				R=0.949, P=0.051
PCR (Proteína C Reactiva)				R=0.473, P=0.088
Daño cutáneo suma				R=0.522, P=0.067
Daño infección EVA				R=0.514, P=0.072

No se observó correlación en la proporción de CMS positivas para ARG-1 y PD-L1 ni en la expresión de dichas moléculas con respecto a las características clínicas ni el nivel de actividad de los pacientes.

DISCUSIÓN

Los hallazgos más importantes de este estudio son que las CMS-Gr y CMS-Mo incluyendo aquellas que expresan ARG-1 y PD-L1 se encuentran aumentadas en pacientes con MII y tienen una mayor expresión de ARG-1. Aunque las CMS se describieron originalmente asociadas a tumores, se ha propuesto que diversos procesos de etiología no tumoral, como enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunitarias (LEG, AR), presentan, de forma similar al cáncer, un patrón de inflamación crónica asociada a inmunosupresión, fenómeno mediado en parte por las CMS. Citocinas como INF- γ , IL-1 β , VEGF e IL-3 se liberan en las patologías inflamatorias y tumorales mencionadas previamente y condicionan la mielopoyesis aumentando la proliferación de precursores

mieloides y bloqueando parcialmente su diferenciación. Este fenómeno resulta en la acumulación de CMS, que luego migran a órganos linfoides secundarios y tejidos, donde ejercen su función supresora.

Acorde con nuestros resultados, las CMS se han encontrado aumentadas en otras enfermedades autoinmunes sistémicas como LEG y AR. En dichas enfermedades la proporción de células mieloides supresoras correlaciona con actividad y con un perfil pro inflamatorio. (34)

En nuestro estudio encontramos un aumento en la proporción y expresión de ARG-1 en CMS-Gr y CMS-Mo. La expresión de la ARG-1 se encuentra altamente inducida en enfermedades que implican el mal funcionamiento del sistema inmune como la glomerulonefritis, en la epidermis de pacientes con psoriasis hiperproliferativa, en pacientes con distintas formas de artritis, en el suero de pacientes con asma crónica, en monocitos activados de pacientes con enfermedades autoinmunes y en células mononucleares de pacientes con tuberculosis pulmonar activa. (35).

Si bien es cierto que esta enzima participa en la regulación de la respuesta inmune, se sabe que en otras enfermedades autoinmunes como LEG, el aumento en la producción de ARG-1 promueve un fenotipo Th17, y además en otras enfermedades autoinmunes como AR se ha visto aumento en ARG-1 lo cual indica que la capacidad reguladora de las CMS y de ARG-1 depende del ambiente en el que se encuentren y que dicha enzima se encuentra aumentada en condiciones pro inflamatorias (36).

De igual forma, las células mieloides supresoras de pacientes con lupus tienen una mayor expresión de ARG1 en comparación con controles sanos y la actividad de esta enzima favoreció la diferenciación hacia Th17. En pacientes con artritis reumatoide, hay un aumento de CMS y ARG-1 medido por ELISA en comparación con controles sanos, lo que correlaciona inversamente con los niveles de Th17 ($r=-0.56$, $p=0.014$). Esto nos lleva a concluir de nueva cuenta que la función de ARG-1 varía de acuerdo con la enfermedad estudiada (37).

La proporción de CMS con expresión de PD-L1 también se observó aumentada en este estudio. PD-L1 es una molécula clave que media la actividad inmunosupresora de las CMS a través de su interacción con el receptor PD-1 en las células T. (37). La importancia de PD-1/PD-L1 en la regulación inmune ha sido reconocida desde hace muchos años, en enfermedades autoinmunes se encarga de la modulación de la activación de linfocitos y respuestas inmunes. Tanto CMS-Mo como CMS-Gr expresan la molécula inmunomoduladora PD-L1, y su nivel de expresión aumenta significativamente tras la estimulación con IFN- γ más LPS. La expresión de PD-L1 a nivel de RNAm se ha observado en pacientes con psoriasis activa, lo cual nos indica que en estados pro inflamatorios también hay una sobre-expresión de dicha molécula (37).

Varias observaciones recientes en pacientes con AR han indicado que las interacciones entre (PD-1)/(PD-L1) podrían desempeñar un papel en la regulación de la hiporeactividad de las células T en líquido sinovial, correlacionando con mayor actividad de la enfermedad (38). Esto también ha sido demostrado mediante la medición de la forma soluble de PD-L1 (sPDL1) en el suero de los pacientes, donde interesantemente se ha visto aumento en los niveles séricos de sPDL1 en pacientes con DM asociada a neoplasia (38).

Finalmente, en este estudio se encontró una correlación entre la proporción de CMS y las variables de actividad y daño en pacientes con MII, lo cual coincide con trabajos previos en LEG, en donde las CMS definidas como CD33⁺, CD11b⁺, HLA-DR⁺, con CD14⁺ o CD66b⁺ para definir población monocítica o granulocítica correlacionaron con el SLEDAI (R^2 0.6, $P=0.0001$ y R^2 0.39 $P=0.0006$ respectivamente) (38).

CONCLUSIONES

Los pacientes con MII tienen una mayor proporción de CMS-Gr con fenotipo inmaduro y CMS-Mo, incluyendo aquellas positivas para ARG-1 y PD-L1. Las CMS-Gr de pacientes con MII expresan una mayor cantidad de ARG-1 que los controles sanos. Las CMS-Gr y CMS-Mo correlacionan con la actividad y daño en MII. Se requieren más estudios para evaluar su capacidad supresora y su relación con otras características clínicas, incluida la presencia de neoplasia.

BIBLIOGRAFIA

1. Milone M. Diagnosis and Management of Immune-Mediated Myopathies. *Mayo Clin Proc.* 2017;92(5):826-37.
2. O'Sullivan PJ GG, Hardiman OM, Farrell MJ, Logan PM. Sonographically guided percutaneous muscle biopsy in diagnosis of neuromuscular disease: a useful alternative to open surgical biopsy. *J Ultrasound Med.* 2006; 25(1):1-6.
3. Eljaszewicz A, Kleina K, Grubczak K, Radzikowska U, Zembko P, Kaczmarczyk P, et al. Elevated Numbers of Circulating Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs) and Intermediate CD14++CD16+ Monocytes in IgA Nephropathy. *Stem Cell Reviews and Reports.* 2018; 14(5):686-93.
4. Nguyen HX, Lusic AJ, Tidball JG. Null mutation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and in vivo. *J Physiol.* 2005;565(Pt 2):403-13.
5. Acosta I. Miopatías inflamatorias idiopáticas: una mirada actualizada al diagnóstico y el manejo. *Rev. méd. Chile* vol.147 no.3 Santiago mar. 2019.
6. Ribechini E, Greifenberg V, Sandwick S, Lutz MB. Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med Microbiol Immunol.* 2010;199(3):273-81.
7. Su Z, Ni P, Zhou C, Wang J. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancers and Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Scand J Immunol.* 2016;84(5):255-61.
8. Boros P, Ochando J, Zeher M. Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity. *Hum Immunol.* 2016;77(8):631-6.
9. Greifenberg V, Ribechini E, Rossner S, Lutz MB. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development. *Eur J Immunol.* 2009;39(10):2865-76.
10. Ballbach M, Dannert A, Singh A, Siegmund DM, Handgretinger R, Piali L, et al. Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells. *Immunol Lett.* 2017;192:1-6.
11. Wang Y, Tian J, Wang S. The potential therapeutic role of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2016;45(4):490-5.
12. Gabrilovich Dmitry I. Myeloid-derived suppressor cell. *Cancer Immunol Res.* 2017 Jan; 5(1): 3–8. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0297
13. Park MJ, Lee SH, Kim EK, Lee EJ, Park SH, Kwok SK, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce the Expansion of Regulatory B Cells and Ameliorate Autoimmunity in the Sanroque Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(11):2717-27.
14. Gabrilovich Dmitry I, Srinivas Nagaraj. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009 Mar;9(3):162-74. doi: 10.1038/nri2506.
15. Fujii W, Ashihara E, Hirai H, Nagahara H, Kajitani N, Fujioka K, et al. Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2013;191(3):1073-81.

16. Filippo Veglia. Myeloid-derived suppressor cells coming of age..*Nat Immunol.* 2018 Feb;19(2):108-119.
17. Wu H, Zhen Y, Ma Z, Li H, Yu J, Xu ZG, et al. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2016;8(331):331ra40.
18. Vlachou K, Mintzas K, Glymenaki M, Ioannou M, Papadaki G, Bertsias GK, et al. Elimination of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Lupus-Prone Mice Linked to Reactive Oxygen Species-Dependent Extracellular Trap Formation. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(2):449-61.
19. Wang Z, Zhu F, Wang J, Tao Q, Xu X, Wang H, et al. Increased CD14(+)HLA-DR(-/low) Myeloid-Derived Suppressor Cells Correlate With Disease Severity in Systemic Lupus Erythematosus Patients in an iNOS-Dependent Manner. *Front Immunol.* 2019;10:1202.
20. Kurko J, Vida A, Glant TT, Scanzello CR, Katz RS, Nair A, et al. Identification of myeloid-derived suppressor cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:281.
21. Crook KR, Jin M, Weeks MF, Rampersad RR, Baldi RM, Glekas AS, et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate T cell and B cell responses during autoimmune disease. *J Leukoc Biol.* 2015;97(3):573-82.
22. Zhang H, Huang Y, Wang S, Fu R, Guo C, Wang H, et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to bone erosion in collagen-induced arthritis by differentiating to osteoclasts. *J Autoimmun.* 2015;65:82-9.
23. Guo C, Hu F, Yi H, Feng Z, Li C, Shi L, et al. Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(1):278-85.
24. Jiao Z, Hua S, Wang W, Wang H, Gao J, Wang X. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlated negatively with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2013;42(2):85-90.
25. Qi J, Li D, Shi G, Zhang X, Pan Y, Dou H, et al. Myeloid-derived suppressor cells exacerbate Sjogren's syndrome by inhibiting Th2 immune responses. *Mol Immunol.* 2018;101:251-8.
26. Sultan SM, Allen E, Oddis CV, Kiely P, Cooper RG, Lundberg IE, et al. Reliability and validity of the myositis disease activity assessment tool. *Arthritis Rheum.* 2008;58(11):3593-9.
27. Alexanderson H LI. Disease-specific quality indicators, outcome measures and guidelines in polymyositis and dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol.* 2007;25(6 Suppl 47):153-8.
28. Richard D. Sontheimer. Would a new name hasten the acceptance of amyopathic dermatomyositis (dermatomyositis sine myositis) as a distinctive subset within the idiopathic inflammatory dermatomyopathies spectrum of clinical illness? Iowa City, Iowa. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:626-36.
29. Leclair V, Lundberg I New Myositis Classification Criteria-What We Have Learned Since Bohan and Peter. *E.Curr Rheumatol Rep.* 2018 Mar 17;20(4):18.
30. Chunqing Guo,Fanlei Hu,Huanfa Yi, Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesisof autoimmune arthritis. 2014

31. Torres-Ruiz, J. Low Density Granulocytes As Biomarkers of Disease Activity and Damage in Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Arthritis Rheumatol.* 2018; 70 (suppl 10).
32. Sigong Zhang, Haili Shen, Xiaoming Shu, Qinglin Peng & Guochun Abnormally increased low-density granulocytes in peripheral blood mononuclear cells are associated with interstitial lung disease in dermatomyositis, *Wang Modern Rheumatology* 2016.
33. Droesser, RA. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2013;49:22332242.
34. Robin J. Flynn Myeloid-derived suppressor cell, arginase-1, IL-17 and cl-CD95L: an explosive cocktail in lupus?, *Ann Transl Med* 2016;4(24):554.
35. Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek C, et al. Arginase 1 Overexpression in Psoriasis. *The American Journal of Pathology.* 2003;162(1):203–211. doi:10.1016/ S0002-9440(10)63811-4. 42.
36. Consoni Francesca Maria. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Ductile Targets in Disease. *Front. Immunol.* 10:949. doi: 10.3389/fimmu.2019.00949.
37. Shipeng Sun. Circulating CD14+ HLA-DR-/low Myeloid-Derived Suppressor Cells as Potential Biomarkers for the Identification of Psoriasis TCM Blood-Heat Syndrome and Blood-Stasis Syndrome. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2020.
38. Frederique M Moret. Moret et al. Synovial T cell hyporesponsiveness to myeloid dendritic cells is reversed by preventing PD-1/ PD-L1 interactions. *Arthritis Research & Therapy* 2014, 16:497.