

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA (CLÍNICA MÉDICA)**

PAMELLA INDIRA DA SILVA OLIVEIRA MENEZES

Dosagem de NETs como biomarcador para o diagnóstico diferencial entre indivíduos ANCA positivos portadores de doenças autoimunes e doenças não autoimunes

**Ribeirão Preto – SP
2023**

PAMELLA INDIRA DA SILVA OLIVEIRA MENEZES

Versão corrigida

Dosagem de NETs como biomarcador para o diagnóstico diferencial entre indivíduos ANCA positivos portadores de doenças autoimunes e doenças não autoimunes

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção de título de Doutora em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira

Ribeirão Preto – SP
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Menezes, Pamella Indira da Silva Oliveira

Dosagem de NETs como biomarcador para o diagnóstico diferencial entre indivíduos ANCA positivos portadores de doenças autoimunes e doenças não autoimunes. Ribeirão Preto, 2023.

50 p.:il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Oliveira, Renê Donizeti Ribeiro.

1. Vasculite Associada a Anticorpo Anticitoplasma de Neutrófilos. 2. Armadilhas Extracelulares. 3. Anticorpos Anticitoplasma de Neutrófilos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Pamela Indira da Silva Oliveira Menezes

Título: Dosagem de NETs como biomarcador para o diagnóstico diferencial entre indivíduos ANCA positivos portadores de doenças autoimunes e doenças não autoimunes

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção de título de Doutora em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus, pela vida, pela saúde, por ser meu sustento em todos os momentos, pela direção e por me permitir viver e conquistar meus sonhos.

Agradeço de coração ao meu orientador, Dr Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira, por me guiar como um pai a uma filha nesta jornada que é a pós-graduação. Obrigada, professor, por sua genialidade, paciência, humildade, incentivo e por sempre acreditar em mim e que eu seria capaz de chegar até o fim. Sem seu auxílio e perseverança, nada disso seria possível. Me inspiro em seu exemplo.

Agradeço à banca de qualificação, Dra Maria Carolina Oliveira e Doutores Rodrigo Santana e Marcelo Menezes pelas contribuições para este trabalho e por serem grandes fontes de aprendizado e crescimento ao longo da minha formação como residente médica.

Agradeço pelos ensinamentos de professores incríveis que tive a oportunidade de conhecer durante as disciplinas da pós-graduação e residência médica, em especial Dr Paulo Louzada Jr, um grande exemplo de sabedoria e liderança.

Agradeço ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil CNPQ e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Projeto FAPESP-CRID 2013/08216-2).

Agradeço, ainda, às pessoas essenciais a minha vida, sem as quais eu não teria chegado aonde cheguei: aos meus pais, Herbert e Matilde, pelo incentivo de sempre, pelos grandes ensinamentos e pelos exemplos que são de caráter e perseverança. Agradeço às minhas irmãs, cunhados, sobrinhas, tias, tios, primos e sogra; por encherem meus dias de alegria e ânimo. Vocês me incentivam a ser uma pessoa melhor e a sempre acreditar que é possível.

Por fim, agradeço ao meu marido, Leonardo Philipe, companheiro de todas as horas, que sempre me apoiou em cada passo e me incentiva diariamente a encarar novos desafios, respeitando minhas escolhas e acreditando mais em mim, do que eu mesma. Obrigada por estar ao meu lado em mais um degrau dessa caminhada.

“Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

A Ele seja a glória para sempre! Amém”

Romanos 11:36

RESUMO

MENEZES, P. I. S. O. **Dosagem de NETs como biomarcador para o diagnóstico diferencial entre indivíduos ANCA positivos portadores de doenças autoimunes e doenças não autoimunes.** 2023.45f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Introdução: Os Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos (ANCA) reagem contra constituintes citoplasmáticos de neutrófilos, podendo ser encontrados nas vasculites associadas ao ANCA (VAA) e em outras doenças autoimunes, infecciosas e neoplásicas. Os ANCA podem levar à formação e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) em pacientes com vasculite autoimune. As NETs podem apresentar diferentes composições proteicas, variando entre doenças distintas e podem ser dosadas através de diferentes antígenos proteicos, com os resultados podendo variar conforme a proteína detectada. **Justificativa:** As NETs possuem conhecida correlação com a atividade de doença nas VAA. Porém, não se sabe se há associação entre as NETs e a presença de ANCA em indivíduos não portadores de VAA. Essa investigação poderia auxiliar no diagnóstico diferencial. **Objetivos:** Avaliar quantitativamente a ocorrência de NETose em indivíduos positivos para ANCA e se os valores séricos de NETs são capazes de distinguir pacientes com relação ao diagnóstico de doenças autoimunes, neoplásicas e infecciosas. **Pacientes e métodos:** Estudo transversal, observacional. A partir dos resultados positivos para ANCA por imunofluorescência indireta, os indivíduos foram divididos em 4 grupos: I: VAA; II: outras doenças autoimunes; III: doenças infecciosas e IV: doenças neoplásicas. Um grupo de controles saudáveis serviu para comparação. As NETs foram avaliadas no soro, através da pesquisa de remanescentes de NETs, ou seja, pela detecção de DNA livre celular ligado a proteínas - histona, mieloperoxidase e elastase neutrofílica (NE). **Resultados:** Dos 194 exames positivos para o ANCA, 146 distribuíram-se da seguinte forma: 63 no Grupo I; 52 no Grupo II; 21 no Grupo III e 10 no Grupo IV. Os demais, 48, tiveram outros diagnósticos. No subgrupo c-ANCA (n=56) havia 75% de pacientes portadores de VAA, contrastando com apenas 23,3% no subgrupo p-ANCA (n=90). Ao subdividirmos os pacientes com relação ao padrão de ANCA, a NE mostrou-se capaz de distinguir os saudáveis e os grupos de doenças em pacientes com p-ANCA ($p < 0,001$): Grupos I e II, portadores de “Doenças Autoimunes” e Grupos III e IV, portadores de “Infecção ou Neoplasia”. Curva ROC para dosagem de NET por NE nos pacientes com p-ANCA, avaliando VAA vs Neoplasia/Infecção, mostrou sensibilidade de 0,65 e especificidade de 0,84, com AUC de 65%. **Discussão:** A formação de NETs envolve processos específicos para cada doença autoimune e, provavelmente, também para outros grupos de doenças com mecanismos fisiopatológicos distintos. Assim, questionamos se o reconhecimento da diversidade da formação de NETs em doenças autoimunes sistêmicas teria implicações como biomarcador para diagnóstico diferencial e, eventualmente, potencial alvo terapêutico. Ao avaliar nossos resultados, podemos supor que quantificar NETs através da detecção de NE seja um meio de distinguir três grupos de indivíduos: saudáveis, portadores de doenças autoimunes e portadores de infecção ou neoplasia.

Palavras-chave: Vasculite Associada a Anticorpo Anticitoplasma de Neutrófilos, Armadilhas Extracelulares, Anticorpos Anticitoplasma de Neutrófilos

ABSTRACT

MENEZES, P. I. S. O. **Measurement of NETs as a biomarker for the differential diagnosis between ANCA positive individuals with autoimmune and non-autoimmune diseases.** 2023. 45f. Doctoral Thesis – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Introduction: Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) react against cytoplasmic constituents of neutrophils and can be found in ANCA-associated vasculitides (AAV) and in other autoimmune, infectious and neoplastic diseases. ANCAs can lead to formation and release of extracellular neutrophil traps (NETs) in patients with autoimmune vasculitis. NETs can have different protein compositions, varying between different diseases and can be measured through different protein antigens, with the results varying according to the detected protein. **Rationale:** NETs are known to correlate with disease activity in AAV. However, it is not known whether there is an association between NETs and the presence of ANCA in individuals without AAV. This investigation could help in the differential diagnosis. **Objectives:** To quantitatively evaluate the occurrence of NETosis in ANCA-positive individuals and whether the serum values of NETs are able to distinguish patients with respect to the diagnosis of autoimmune, neoplastic and infectious diseases. **Patients and methods:** Cross-sectional, observational study. From the positive results for ANCA by indirect immunofluorescence, the individuals were divided into 4 groups: I: AAV; II: other autoimmune diseases; III: infectious diseases and IV: neoplastic diseases. A group of healthy controls served for comparison. The NETs were evaluated in the serum, through the investigation of NET remnants, that is, by the detection of free cellular DNA bound to proteins - histone, myeloperoxidase and neutrophilic elastase (NE). **Results:** Of the 194 positive tests for ANCA, 146 were distributed as follows: 63 in Group I; 52 in Group II; 21 in Group III and 10 in Group IV. The others, 48, had other diagnoses. In the c-ANCA subgroup (n=56) there were 75% of patients with AAV, in contrast to only 23.3% in the p-ANCA subgroup (n=90). When we subdivided patients according to ANCA pattern, EN was able to distinguish healthy and disease groups in patients with p-ANCA ($p < 0.001$): Groups I and II, with “Autoimmune Diseases” and Groups III and IV, carriers of “Infection or Neoplasia”. ROC curve for NET measurement by NE in patients with p-ANCA, evaluating AAV vs Neoplasm/Infection, showed a sensitivity of 0.65 and specificity of 0.84, with an AUC of 65%. **Discussion:** The formation of NETs involves specific processes for each autoimmune disease and, probably, also for other groups of diseases with different pathophysiological mechanisms. Thus, we question whether the recognition of the diversity of NETs formation in systemic autoimmune diseases would have implications as a biomarker for differential diagnosis and, eventually, a potential therapeutic target. When evaluating our results, we can assume that quantifying NETs through the detection of EN is a means of distinguishing three groups of individuals: healthy individuals, carriers of autoimmune diseases and carriers of infection or neoplasia.

Keywords: Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis, extracellular traps, antineutrophil cytoplasmic antibodies

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama do estudo	22
Figura 2 - Distribuição dos exames positivos para ANCA, de acordo com o subtipo do ANCA, entre os pacientes classificados nos 4 grupos (n=146).....	26
Figura 3 - Comparação da dosagem de NETs entre o total de pacientes dos 4 grupos (n=145), por proteínas detectadas no teste, versus a dosagem de NETs nos pacientes controles (n=16).....	27
Figura 4 - Comparação da dosagem de NET por grupos de pacientes (n=145), por proteínas detectadas no teste	28
Figura 5 - Comparação da dosagem de NET para todos os pacientes com positividade para p-ANCA (n=89) e c-ANCA (n=56), por proteínas detectadas no teste.....	29
Figura 6 - Comparação da dosagem de NET por elastase neutrofílica (NE) entre pacientes p-ANCA (n=89), divididos entre Doenças autoimunes vs Neoplasia/Infecção e controles e Vasculites ANCA vs Neoplasia/Infecção e controles (n=16)	30
Figura 7 - Curva ROC para dosagem de NET por NE nos pacientes com p-ANCA, avaliando VAA vs controles	31
Figura 8 - Curva ROC para dosagem de NET por NE nos pacientes com p-ANCA, avaliando Neoplasia/Infecção vs VAA.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Apresentação dos diagnósticos encontrados nos grupos dos não-vasculites associadas ao ANCA (VAA).....	23
Tabela 2 – Caracterização clínica.....	24
Tabela 3 – Atividade da doença, danos a órgãos e terapia de pacientes com VAA....	25
Tabela 4 – Valores de NETs de acordo com a proteína detectada nos testes.....	27
Tabela 5 – Comparação da dosagem da NET entre p-ANCA e c-ANCA, por grupos de doenças, com 3 proteínas	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Anticorpos antinucleares
ANCA	Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos
ASCA	Anticorpo anti- <i>saccharomyces cerevisiae</i>
BPI	Proteína bactericida de aumento da permeabilidade
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BVAS	<i>Birmingham Vasculitis Activity Score</i>
CitH3	Histona 3 citrulinada
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças inflamatórias intestinais
dsDNA	DNA de fita dupla
ELISA	Ensaio imunossorvente de ligamentos enzimáticos
eTFG	Taxa de filtração glomerular estimada
GEPA	Granulomatose eosinofílica com poliangiíte
GPA	Granulomatose com poliangiíte
HC-FMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HMGB-1	Proteína cromossômica 1 do grupo de alta mobilidade
IFI	Imunofluorescência indireta
MMP-9	Matriz metaloproteinase 9
MPO	Mieloperoxidase
NE	Elastase neutrofílica
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i> (armadilhas extracelulares de neutrófilos)
PAD4	Proteína arginina deiminase 4
PAM	Poliangiíte microscópica
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Proteína C-reativa
PR3	Proteinase 3
RCU	Retocolite ulcerativa
ROS	Compostos reativos de oxigênio
USP	Universidade de São Paulo
VAA	Vasculites associadas ao ANCA
VAS	Vias aéreas superiores

SUMÁRIO

1 Introdução	13
2 Justificativa	17
3. Objetivos	18
3.1. Principal	18
3.2. Secundário	18
4. Métodos	19
4.1. Desenho do estudo	19
4.2. Critérios de inclusão	19
4.3. Critérios de exclusão	19
4.4. Avaliação clínica	20
4.5. Avaliação da positividade para o ANCA	20
4.6. Avaliação da NETose	20
4.7. Análise estatística	20
4.8. Aspectos éticos	21
5. Resultados	22
6. Discussão	32
7. Conclusão	40
Referências	41
APÊNDICE	45
Apêndice A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	46
Apêndice B. Ficha de coleta de dados	49

1. INTRODUÇÃO

Os Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) agem contra constituintes citoplasmáticos de neutrófilos e monócitos. Foram descritos pela primeira vez em 1982, após achado de um fator que corava o citoplasma de neutrófilos na imunofluorescência indireta do soro de pacientes portadores de glomerulonefrite segmentar necrotizante (DAVIES *et al.*, 1982).

Os ANCA são capazes de estimular neutrófilos a produzir compostos reativos de oxigênio (ROS) e a liberar enzimas líticas. Em diversos sistemas *in vitro*, os ANCA são capazes de induzir a adesão neutrofílica às células endoteliais, estimulando a lise destas células ou sua segregação. A interação entre neutrófilos e os ANCA ocorre através da ligação do fragmento Fab destes às enzimas ou aos receptores Fcγ expressos naqueles (HOCHBERG *et al.*, 2019).

Os neutrófilos possuem dois tipos de grânulos em seu citoplasma: os azurófilos ou primários e os específicos ou secundários. Os grânulos primários, alvos de reconhecimento pelos ANCA, possuem como função a morte e digestão de microorganismos. Em seu interior são encontradas enzimas microbidas, como mieloperoxidase (MPO) e lisozima, e proteinases neutras, como elastase, catepsina G e proteinase 3 (PR3) (RADU; LEVI, 2005).

A pesquisa dos ANCA auxilia o diagnóstico das vasculites primárias de pequenos vasos. São demonstrados nestas doenças utilizando-se da combinação de Imunofluorescência Indireta (IFI) de neutrófilos no sangue periférico e Ensaio imunossorvente de ligamentos enzimáticos (ELISA). Segundo o Consenso Internacional de Pesquisa do ANCA, de 1999, a IFI deve ser usada como o método de triagem inicial para detectar a presença de ANCA e as amostras com resultado positivo devem então ser testadas por ELISA para detectar os anticorpos específicos para PR3 e MPO (SAVIGE *et al.*, 1999). Autoanticorpos específicos para proteinase 3 (PR3-ANCA) e mieloperoxidase (MPO-ANCA) são encontrados em mais de 90% dos pacientes com vasculite primária associada ao ANCA ativa e estes são importantes como ferramentas de diagnóstico (SÖDERBERG; SEGELMARK, 2016).

Dois principais padrões de fluorescência foram demonstrados na IFI com neutrófilos fixados em etanol: c-ANCA, fluorescência granular citoplasmática difusa, mais proeminente centralmente, entre os lobos nucleares, cujos anticorpos são dirigidos contra PR3; e p-ANCA, padrão de coloração perinuclear frequentemente com extensão nuclear, cujos anticorpos são dirigidos contra a MPO (CSERNOK; MOOSIG, 2014).

Lesavre *et al.* (1993) mostrou que a presença de ANCA contra antígenos citoplasmáticos de neutrófilos diferentes da MPO e PR3 é reportada mais frequentemente em pacientes com condições clínicas diferentes das vasculites associadas ao ANCA (VAA), tais como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, doenças hepáticas crônicas e condições infecciosas como no HIV. Em publicação de 1993, foi descrito o ANCA atípico como sendo o ANCA detectado pela IFI que não fosse direcionado contra MPO ou PR3. Definindo como um conjunto heterogêneo de autoanticorpos contra uma variedade de antígenos citoplasmáticos de neutrófilos, que mais frequentemente dão um padrão de ligação semelhante a p-ANCA. Alguns destes antígenos, como a elastase neutrofílica (NE), lactoferrina, CAP57 e catepsina G, já foram também caracterizados em pacientes com vasculites. Mostrando a importância da determinação da especificidade antigênica por ELISA, para diferenciar p-ANCA contra MPO de outros antígenos de especificidade indefinida (LESAYRE *et al.*, 1993).

Com relação aos ensaios ELISA, ao longo dos últimos 10 anos houve melhora do desempenho destes testes e os exames atualmente disponíveis são altamente sensíveis e específicos para o diagnóstico das vasculites primárias de pequenos vasos associadas ao ANCA (DAMOISEAUX *et al.*, 2017).

As VAA caracterizam-se por inflamação necrotizante de pequenos vasos e escassa deposição de imunocomplexos (paucimune), sendo conhecidas como: granulomatose com poliangiíte (GPA - antiga granulomatose de Wegener), poliangiíte microscópica (PAM) e granulomatose eosinofílica com poliangiíte (GEPa - antiga síndrome de Churg-Strauss). A incidência anual das VAA é estimada em cerca de 10 a 20 pacientes por milhão (MILLET *et al.*, 2014).

Segundo o Consenso Internacional para Testagem do ANCA de 1999 (SAVIGE *et al.*, 1999), revisado em 2017 (BOSSUYT *et al.*, 2017), a dosagem dos Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos deve ser realizada em situações em que haja as seguintes indicações clínicas: glomerulonefrite (especialmente rapidamente progressiva), hemorragia pulmonar (especialmente síndrome pulmão-rim), vasculite cutânea (com características sistêmicas), múltiplos nódulos pulmonares, doença destrutiva crônica das vias aéreas superiores (VAS), sinusite ou otite de longa data, estenose traqueal subglótica, mononeurite múltipla ou outra neuropatia periférica, massa retro-orbital e esclerite. Na ausência de causas óbvias para esses quadros clínicos, essas manifestações clínicas sugerem o diagnóstico de granulomatose com poliangiíte ou poliangiíte microscópica e indicam que o teste do ANCA é necessário. E, quando estão presentes, a demonstração de ANCA é provavelmente 95% sensível e 90% específica para essas doenças e tem um valor preditivo positivo maior do que em pacientes com outras doenças.

Os ANCAs podem ser encontrados também em outras condições clínicas (BOSSUYT *et al.*, 2017), como pacientes com distúrbios gastrointestinais, tais como doenças inflamatórias intestinais (DII), colangite esclerosante primária e doenças inflamatórias hepáticas (hepatite autoimune, cirrose biliar primária e hepatite viral crônica). Estas doenças estão associadas ao padrão p-ANCA atípico. Nos distúrbios gastrointestinais, o p-ANCA é principalmente observado em pacientes com retocolite ulcerativa (50-67%), mas também em pacientes com doença de Cröhn (6-15%) (BOSSUYT, 2006).

A associação entre neoplasias malignas e vasculites associadas ao ANCA é rara, tendo sido descrita com neoplasias sólidas e hemopatias malignas de origem linfóide ou mieloide (PHILIPPONNET *et al.*, 2016). Estudos sugerem que infecções podem ter um papel central na formação dos ANCAs e que infecções crônicas podem mimetizar o quadro clínico das VAA. O ANCA associado à infecção pode ser desencadeado por disfunções imunes em resposta a peptídeos microbianos. Há relatos da presença do ANCA durante o curso de infecções virais (hepatites B e C, mononucleose infecciosa, parvovirose B19, infecção pelo HIV), bacterianas (por *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bartonella* e bactérias Gram-negativas), fúngicas (por *Aspergillus*, *Histoplasma*) e parasitárias (por *Plasmodium*, *Entamoeba histolytica*) (KONSTANTINOV; ULFF-MØLLER; TZAMALOUKAS, 2015).

Estudos sugerem que os ANCAs podem ser responsáveis pela ativação da formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos, as NETs, em pacientes com vasculite autoimune. As NETs, descritas pela primeira vez em 2004 (BRINKMANN *et al.*, 2004), são redes extracelulares de estruturas do DNA com componentes granulares, histonas e proteínas citoplasmáticas. Durante o fenômeno da NETose as membranas nucleares e granulares se desintegram e enzimas, como NE e MPO, são liberadas (FRANGOU *et al.*, 2019).

Sob condições fisiológicas, os neutrófilos liberam NETs como mecanismo de defesa para prender e matar bactérias, fungos e vírus. Estímulos estéreis, como urato monossódico e cristais de pirofosfato de cálcio também podem induzir a formação de NETs (LEE *et al.*, 2017).

A formação desregulada de NETs está implicada em várias condições clínicas, como sepse, doenças autoimunes e auto-inflamatórias, trombose venosa e arterial, infarto agudo do miocárdio, câncer e fibrose. As NETs contêm proteínas pró-inflamatórias e acredita-se que, no caso das VAA, contribuam diretamente para a inflamação dos vasos, danificando as células endoteliais e ativando o sistema complemento, atuando como um elo entre o sistema imune inato e o adaptativo através da geração de PR3-ANCA e MPO-ANCA (SÖDERBERG *et al.*, 2015).

Kraaij *et al.* (2018) mostraram formação excessiva de NETs em amostras pareadas de 10 pacientes com VAA em atividade, sendo significativamente menor quando a doença estava em remissão; sugerindo formação excessiva de NETs associada à atividade clínica da doença. Além disso, no momento da hospitalização de pacientes com VAA, observou-se excessiva formação de NETs naqueles admitidos por recorrência da doença quando comparados a pacientes internados por infecção grave (KRAAIJ *et al.*, 2018).

O mecanismo de formação de NETs pode variar entre doenças distintas. Em 2019, Van Dam *et al.* avaliaram a diferença entre a formação e a composição de NETs entre as VAA e LES. Tendo visto que há uma diferença quantitativa entre a formação de NETs induzida por essas doenças e que isto foi associado a uma aparência morfológica e de composição proteica diferente (VAN DAM *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

A NETose possui conhecida correlação com a atividade de doença nas VAAs, além de associação com a formação dos próprios ANCAs. Porém, não se sabe se há correlação da NETose com o ANCA presente em outras doenças, como infecções e neoplasias. Determinar se há associação entre a ocorrência de NETose e o ANCA em doenças que não as VAAs pode auxiliar no diagnóstico diferencial entre as VAA e os demais grupos de doenças.

3. OBJETIVOS

3.1. Principal

- Avaliar quantitativamente a ocorrência de NETose em grupos de indivíduos com positividade para o ANCA, de diferentes diagnósticos, comparando-os entre si.

3.2. Secundário

- Avaliar se os valores encontrados de NETose são capazes de distinguir pacientes ou grupos de pacientes com relação ao diagnóstico.

4. MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo

Trata-se de estudo transversal, observacional. A partir dos resultados positivos para detecção de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) por Imunofluorescência indireta (IFI) nos exames realizados no Laboratório de Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, os prontuários dos pacientes foram avaliados e a NETose foi quantificada na mesma amostra de soro com positividade para ANCA. Os pacientes foram então subdivididos em 4 grupos, de acordo com a conclusão diagnóstica feita pela equipe médica assistente, da seguinte forma:

- Grupo I: pacientes com diagnóstico de vasculites associadas ao ANCA.
- Grupo II: pacientes com diagnóstico de outra doença autoimune (reumatológica, doença inflamatória intestinal, hepática, outras).
- Grupo III: pacientes com diagnóstico de doença infecciosa.
- Grupo IV: pacientes com diagnóstico de doença neoplásica.

Posteriormente, para questão de análise estatística, os pacientes foram agrupados em 2 grupos: 1) Doenças autoimunes (grupos I e II) e 2) Doenças infecciosas/neoplásicas (grupos III e IV).

Para comparação dos valores de NETs no soro dos pacientes, realizamos comparação com dosagem de NETs no soro de controles saudáveis, pareados por sexo e idade, quando possível. Para compor o grupo controle foram selecionadas pessoas saudáveis, funcionários do HC e da FMRP, que aceitaram participar de forma voluntária. Sendo considerados “saudáveis” os indivíduos que não possuíam doenças autoimunes, infecciosas crônicas ou neoplásicas. Demais doenças foram permitidas, como HAS e DM2, assim como nos indivíduos dos 4 grupos de estudo.

4.2. Critérios de inclusão

- Pacientes portadores de resultado positivo para a pesquisa do ANCA por IFI.
- Acompanhamento nos ambulatórios ou enfermarias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP).
- Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

4.3. Critérios de exclusão

- Foram excluídos os pacientes sem diagnóstico definido ou com diagnóstico que não permitiu classificação em algum dos grupos.

4.4. Avaliação clínica

Os dados clínicos e laboratoriais obtidos, referentes ao diagnóstico da doença principal e comorbidades, foram colhidos através da revisão de prontuário médico, com o preenchimento da Ficha de coleta de dados (Apêndice B).

4.5. Avaliação da positividade para o ANCA

Para pesquisa do ANCA, foi realizado o método de IFI, na qual neutrófilos são previamente fixados em uma superfície (lâmina de vidro). O soro do paciente é então adicionado à lâmina para que seus ANCAs, se presentes, se liguem às proteínas citoplasmáticas. Em uma segunda etapa, anticorpos marcados com fluoresceína e direcionados contra porção Fc de imunoglobulinas são adicionados, permitindo ligação destes aos ANCAs eventualmente ligados a proteínas na região citoplasmática ou perinuclear.

4.6. Avaliação da NETose

A NETose foi avaliada na amostra de soro dos controles saudáveis e na mesma amostra de soro com positividade para ANCA dos pacientes, pela quantificação de DNA livre celular ligado a proteínas (MPO, NE e histona).

Para a realização do teste, inicialmente foi feito o revestimento das placas de microtitulação (Black plate, Clear Bottom 3603) com os anticorpos anti-MPO (marca invitrogen PAS-16672), anticorpo anti-histona (marca Sigma-H0164) e anticorpo anti-NE (marca Sigma-SAB5500151), em placas separadas, na diluição de 1:1000 com PBS (Phosphate Buffered Saline) a 1x; levando após para a incubação *overnight*. No segundo dia, foi feita a selagem das placas com PBS 1x + BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 2%, inserindo após as amostras e deixando novamente para incubação *overnight*. No terceiro dia, foi realizada a revelação, utilizando o *kit* de marcação de DNA (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay®), sendo acrescentado o PicoGreen® nos poços das amostras e na montagem da curva. O reagente PicoGreen® dsDNA é um corante ultrasensível de ácido nucleico fluorescente para quantificar DNA de fita dupla (dsDNA) em solução, detectando e quantificando pequenas quantidades de DNA. Em seguida, as placas foram levadas para leitura com comprimentos de onda de excitação de 480 nm e de emissão de 520 nm.

4.7. Análise estatística

A estatística descritiva será apresentada por meio de mediana e intervalo interquartil ou média e desvio-padrão, em distribuição normal. A comparação das medianas entre os grupos foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis ou de ANOVA, para distribuição normal, seguida, respectivamente, do teste de comparações múltiplas de Dunn ou do teste de

comparações múltiplas de Tukey. Para todos os testes, $p < 0,05$ foi considerado para significância estatística.

4.8. Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, parecer número 4347205.

Este estudo teve como metodologia a análise de prontuários, bem como o uso de amostras de soro coletadas durante a investigação diagnóstica dos pacientes selecionados.

Para todos os pacientes selecionados não houve qualquer risco, dano, exposição, limitação ou comprometimento do tratamento realizado nesta Instituição.

5. RESULTADOS

Foram encontrados 194 exames positivos para o ANCA de janeiro de 2020 até junho de 2021, nos exames realizados pelo Laboratório de Imunologia Clínica do HC-RP. Através da revisão de prontuários, foram avaliadas as características clínicas, laboratoriais e a conclusão diagnóstica feita pela equipe assistente, levando à subdivisão dos pacientes na seguinte forma: Grupo I (Vasculites associadas ao ANCA): 63 pacientes; Grupo II (Outras doenças autoimunes): 52 pacientes; Grupo III (Doenças infecciosas): 21 pacientes; Grupo IV (Doenças neoplásicas): 10 pacientes.

Foram excluídos 46 pacientes com diagnóstico indefinido ou outras doenças não enquadradas nos grupos anteriores e 2 pacientes por não haver confirmado a presença de qualquer doença, conforme mostra a Figura 1.

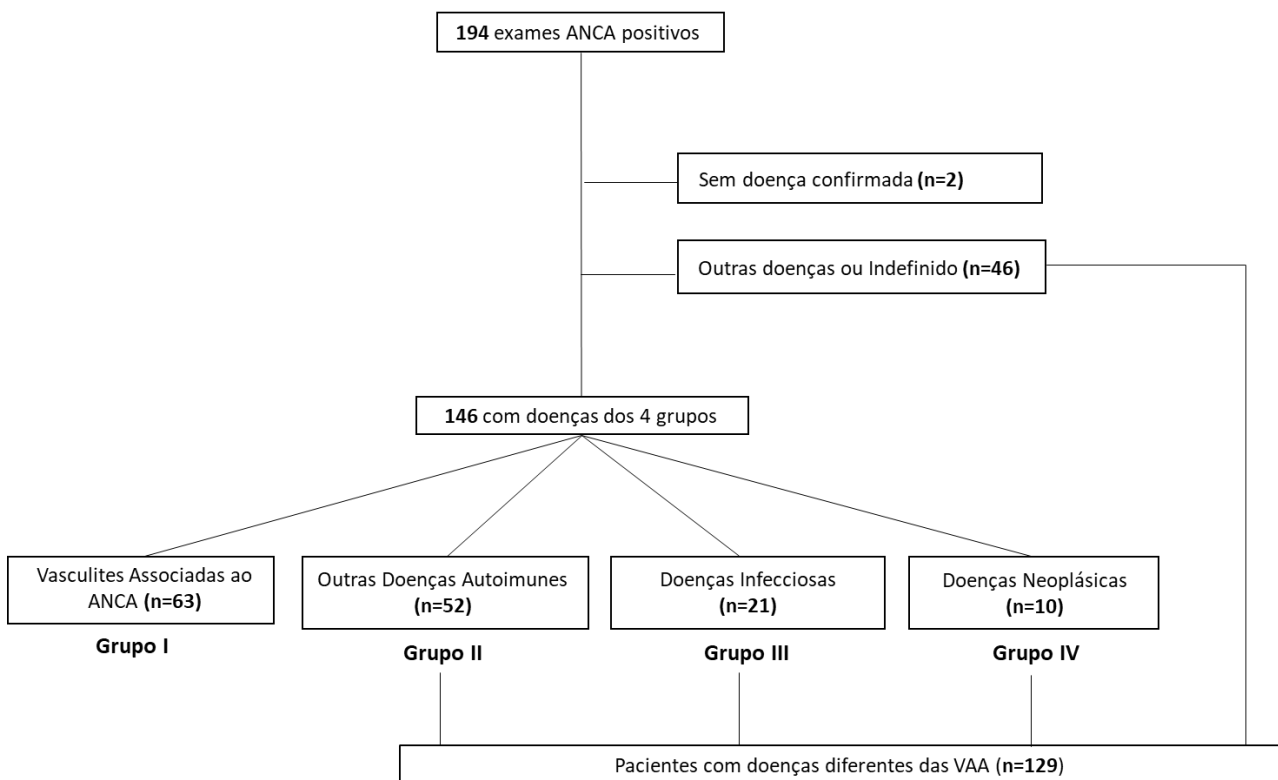


Figura 1. Diagrama do estudo.

Fonte: Autor.

Conforme visto no diagrama, dentre os 194 exames ANCA positivos, foram encontrados 129 pacientes com positividade do ANCA, porém sem possuir diagnóstico de VAA,

que são os grupos II (n=52), III (n=21) e IV (n=10) somados a outras doenças ou indefinido (n=46). Sendo esses pacientes portadores das mais diversas doenças, em sua maioria outras doenças autoimunes (n=52; 40%), como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais, hepatite autoimune, colangite esclerosante e esclerose múltipla. Outras doenças ou casos indefinidos somaram 36% do total (n=46), englobando doença de Fabry, deficiência de Proteína S, amiloidose e doença do telômero curto. As doenças infecciosas (n=21; 16%) incluíram casos de SIDA, tuberculose, histoplasmose, paracoccidiodomicose, hepatite C e outras micobacterioses. Já as doenças neoplásicas apareceram em menor proporção (n=10; 8%), englobando diagnósticos como linfoma não-Hodgkin, mieloma múltiplo, meningioma e carcinoma urotelial, neuroendócrino e de ovário; conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Apresentação dos diagnósticos encontrados nos grupos dos não-vasculites associadas ao ANCA (VAA)

Diagnósticos encontrados entre as não-vasculites associadas ao ANCA	n=129
OUTRAS DOENÇAS AUTOIMUNES	52 (40%)
Lúpus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatoide, Esclerose Sistêmica, Retocolite Ulcerativa, Colangite Esclerosante, Hepatite Autoimune, Doença de Crohn, Neuromielite Óptica, Esclerose Múltipla	
DOENÇAS INFECCIOSAS	21 (16%)
SIDA, Tuberculose, Histoplasmose, Paracoccidiodomicose, Hepatite C, Outras Micobacterioses	
DOENÇAS NEOPLÁSICAS	10 (8%)
Linfoma Não-Hodgkin, Mieloma Múltiplo, Meningioma, Carcinoma Urotelial, Carcinoma Neuroendócrino, Carcinoma Seroso do Ovário	
OUTRAS DOENÇAS OU INDEFINIDO	46 (36%)
Doença de Fabry, Deficiência de Proteína S, Glomerulosclerose segmentar focal, Asma, Paraparesia Espástica Familiar, Doença do Telômero Curto, Pelagra, Amiloidose AA	

Fonte: Autor.

Nos grupos VAA, outras doenças autoimunes e doenças infecciosas houve predominância do gênero feminino. Apenas no grupo de neoplasias houve inversão desse quadro, mostrando uma proporção de 1,5 homens para cada mulher. A média de idade apresentou-se menor no grupo de outras doenças autoimunes (37,1 anos) e maior no grupo de neoplasias (67,3 anos). O tempo entre o início dos sintomas e a solicitação do ANCA, calculado em meses, foi menor no grupo das doenças infecciosas (média de 9,8 meses); sendo o maior intervalo de tempo encontrado no grupo das VAA (média de 24 meses).

O padrão c-ANCA predominou no grupo das VAA, sendo esse achado invertido nos demais grupos, nos quais predominou o p-ANCA, com a maior diferença proporcional no grupo de neoplasias (9:1), seguido de 5,5:1 no grupo de outras doenças autoimunes e 3,2:1 no grupo de doenças infecciosas. Houve maior porcentagem de óbitos no grupo das neoplasias (50%), seguido do grupo de doenças infecciosas (33%); e em menor número no grupo das outras doenças autoimunes (9,6%). Os dados obtidos são mostrados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Caracterização clínica

	Grupo I (n=63)	Grupo II (n=52)	Grupo III (n=21)	Grupo IV (n=10)	Controles (n=16)
Gênero (H:M)	0,53:1,0	0,4:1,0	0,9:1,0	1,5:1,0	0,56:1,0
Idade (média ± DP)	48,9 ± 20,4	37,1 ± 16,2	53,4 ± 16,2	67,3 ± 12,8	37,3 ± 8,32
Tempo de sintomas em meses (média ± DP)	24,1 ± 37	17,4 ± 25,5	9,8 ± 17,1	18,8 ± 14,8	-
p-ANCA, n (%)	21 (33%)	44 (85%)	16 (76%)	9 (90%)	0
c-ANCA, n (%)	42 (67%)	8 (15%)	5 (24%)	1 (10%)	0
Relação p-ANCA:c-ANCA	0,5:1	5,5:1	3,2:1	9:1	-
Óbito [n (%)]	13 (20,6%)	5 (9,6%)	7 (33%)	5 (50%)	-

Fonte: Autor. H: homens; M: mulheres; DP: Desvio padrão da média.

Tabela 3. Atividade da doença, danos a órgãos e terapia de pacientes com VAA.

	Grupo I (n=63)	Terapia	Grupo I (n=63)
ELISA MPO	21 (33%)	CE + CYC	29 (46%)
ELISA PR3	42 (67%)	CE + MTX	3 (5%)
GPA	39 (62%)	CE + AZA	2 (3%)
PAM	16 (25%)	Nenhuma	29 (46%)
GEPA	8 (13%)		
BVAS	13 ± 5.1		
VDI	1.5 (1.0-2.0)		

MPO - mieloperoxidases; PR3 - proteinase 3; GPA - granulomatose com poliangiite; PAM - poliangiite microscópica; GEPA - granulomatose eosinofílica com poliangiite; BVAS - índice de atividade de vasculite de Birmingham; VDI - índice de danos de vasculite; CE - corticosteroide; CYC - ciclofosfamida; MTX - metotrexato; AZA - azatioprina.

Fonte: Autor.

Ao dividir o total de pacientes classificados nos 4 grupos (**n=146**) de acordo com o padrão do ANCA, encontramos uma predominância do p-ANCA em 90 pacientes (61,6%); estando o c-ANCA presente em apenas 56 (38,3%) pessoas. Na avaliação intra-grupos, encontramos uma predominância do diagnóstico de VAAs no grupo c-ANCA (75%) e predomínio dos demais diagnósticos no grupo p-ANCA (76,7%); como mostra a Figura 2.

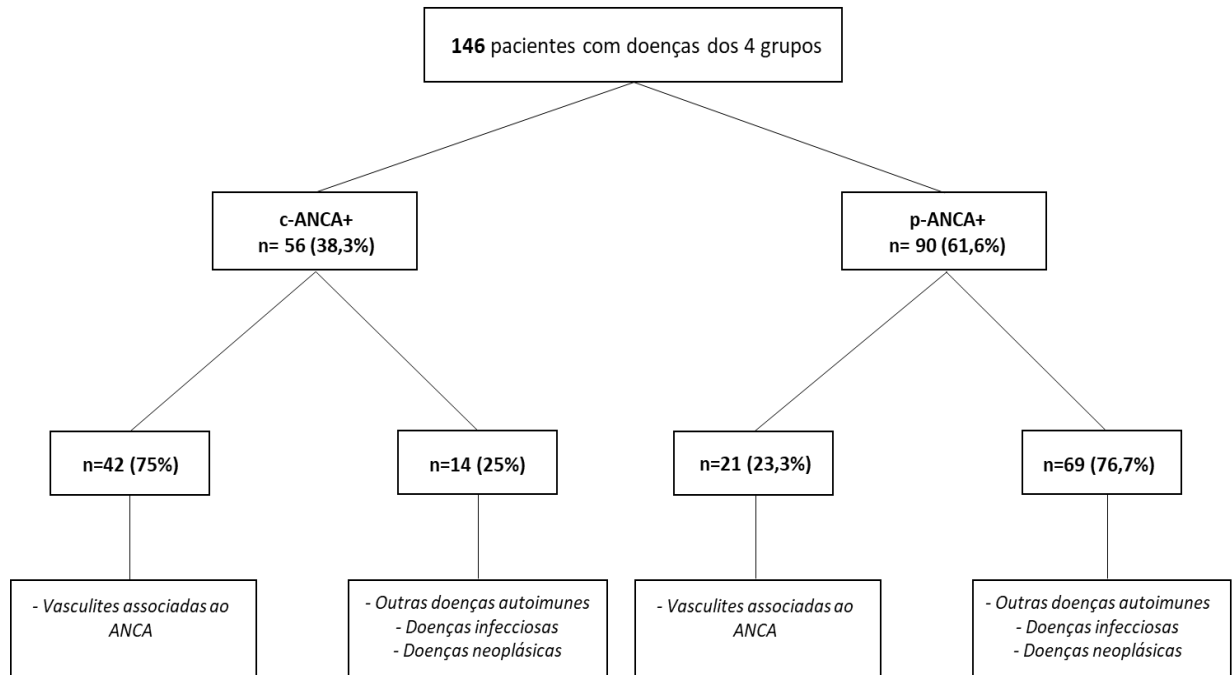


Figura 2. Distribuição dos exames positivos para ANCA, de acordo com o subtipo do ANCA, entre os pacientes classificados nos 4 grupos (n=146).

Fonte: Autor.

O valor preditivo positivo do c-ANCA para o diagnóstico das VAA na amostra analisada foi de 75,9%; já o valor preditivo positivo do p-ANCA para as VAA foi de 21,6%. Ao avaliar a dosagem da NETose entre todos os pacientes e separadamente por grupos de doenças e controles saudáveis, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as proteínas utilizadas no teste. Tendo a histona apresentado a maior média entre os grupos e a NE a menor média; como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Valores de NETs de acordo com a proteína detectada nos testes.

	MPO	NE	Histona	p
Quatro grupos (n=146) (média ± DP)	4,51 ± 1,24	3,76 ± 1,45	5,510 ± 1,43	<0,0001*
Grupo I (n=63) (média ± DP)	4,48 ± 1,25	3,90 ± 1,60	5,64 ± 1,33	<0,0001*
Grupo II (n=52) (média ± DP)	4,65 ± 1,28	3,37 ± 1,22	5,18 ± 1,60	<0,0001**
Grupos III e IV (n=31) (média ± DP)	4,36 ± 1,18	4,12 ± 1,38	5,80 ± 1,24	<0,0001**
Controles (n=16) (média ± DP)	1,32 ± 0,06	1,09 ± 0,57	3,31 ± 0,24	<0,0001**

DP - desvio padrão da média; MPO - Mieloperoxidase; NE - Elastase Neutrofílica; * Teste de Dunn; ** Teste de Tukey.

Fonte: Autor.

Ao compilarmos os dados da tabela 3 em forma de gráfico, podemos ver de forma clara a diferença dos valores de NETs por proteína utilizada, encontrados no total de pacientes dos 4 grupos, comparativamente aos controles, mostrando que há uma diferença significativa entre todos os grupos e os controles saudáveis, como mostra a Figura 3.

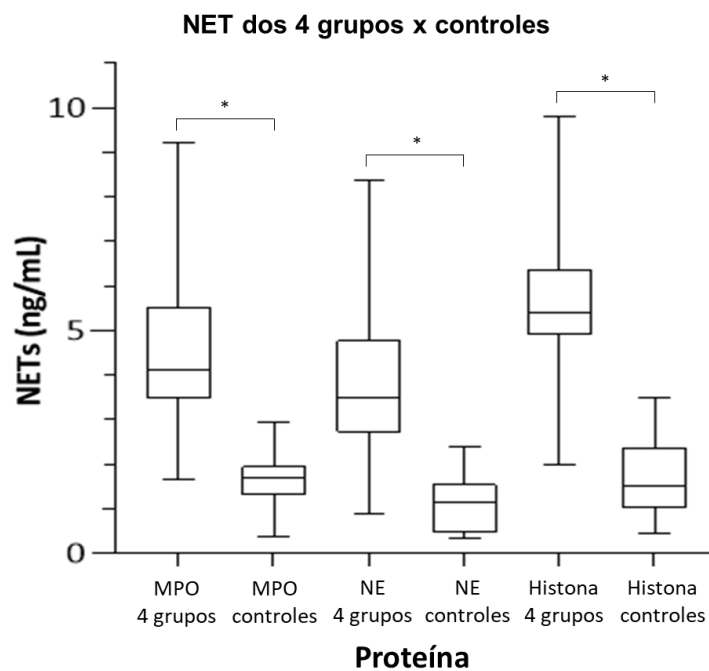


Figura 3. Comparação da dosagem de NETs entre o total de pacientes dos 4 grupos (n=146), por proteína detectada no teste, versus a dosagem de NETs nos pacientes controles (n=16).

*: teste de Dunn, $p < 0,001$

Fonte: Autor.

Na análise intra-grupos, viu-se que no grupo I houve diferença, com significância estatística ($p < 0,001$), ao se comparar a dosagem de MPO versus histona e NE versus histona. No grupo II, foi visto significância estatística na comparação da dosagem de MPO versus NE e NE versus histona, com $p < 0,001$. Na avaliação dos grupos III e IV em conjunto, houve significância estatística, com $p < 0,001$ na comparação MPO versus histona e NE versus histona. Como mostra a Figura 4.

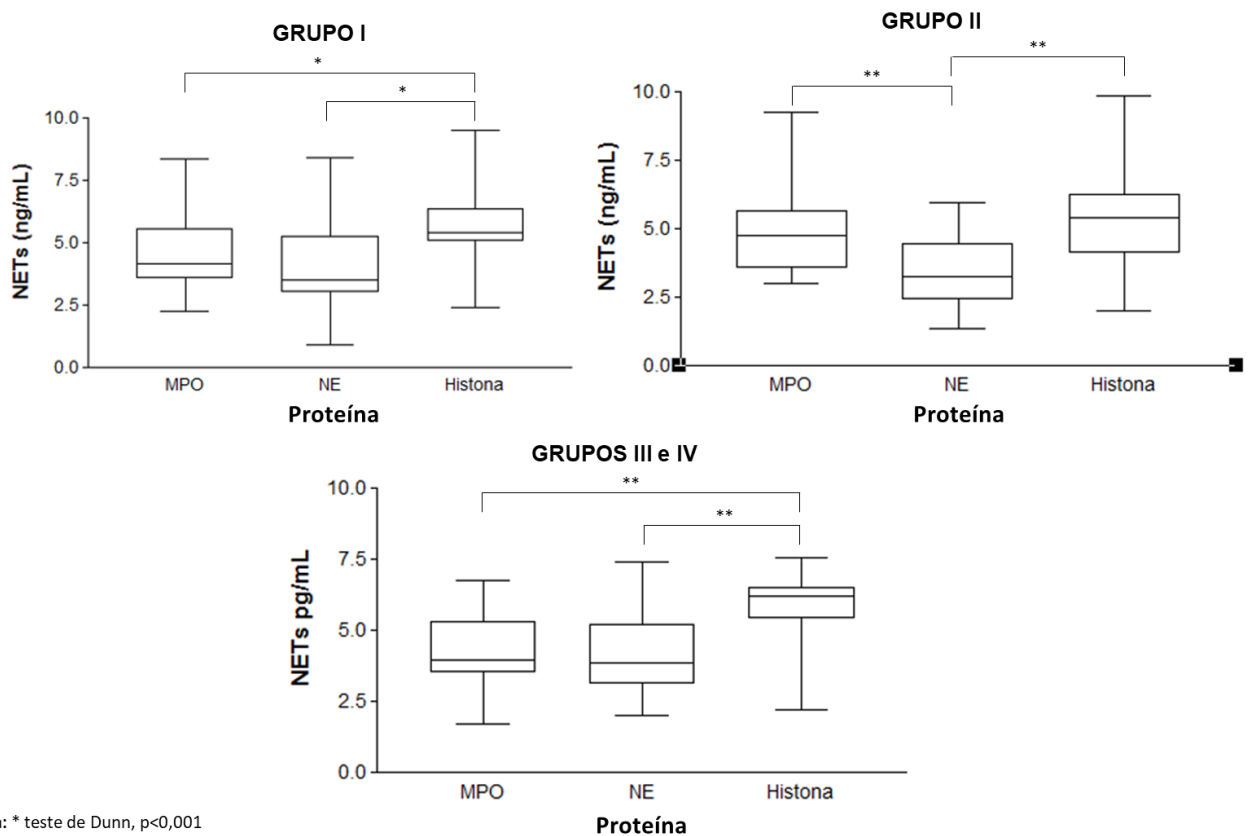


Figura 4. Comparação da dosagem de NET por grupos de pacientes ($n=146$), por proteínas detectadas no teste.

Fonte: Autor.

Outras análises foram realizadas, ao dividirmos o total de pacientes em dois grupos baseados no padrão de ANCA, sendo p-ANCA x c-ANCA. Tendo sido notada diferença estatisticamente significativa entre as proteínas utilizadas para dosagem da NET, com $p < 0,001$, no grupo p-ANCA, nas comparações entre a dosagem por MPO versus NE, MPO versus histona e NE versus histona (Figura 5).

No grupo c-ANCA houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre a dosagem por MPO versus NE e $p < 0,001$ na comparação entre MPO versus

histona e NE versus histona; como mostra a Figura 5.

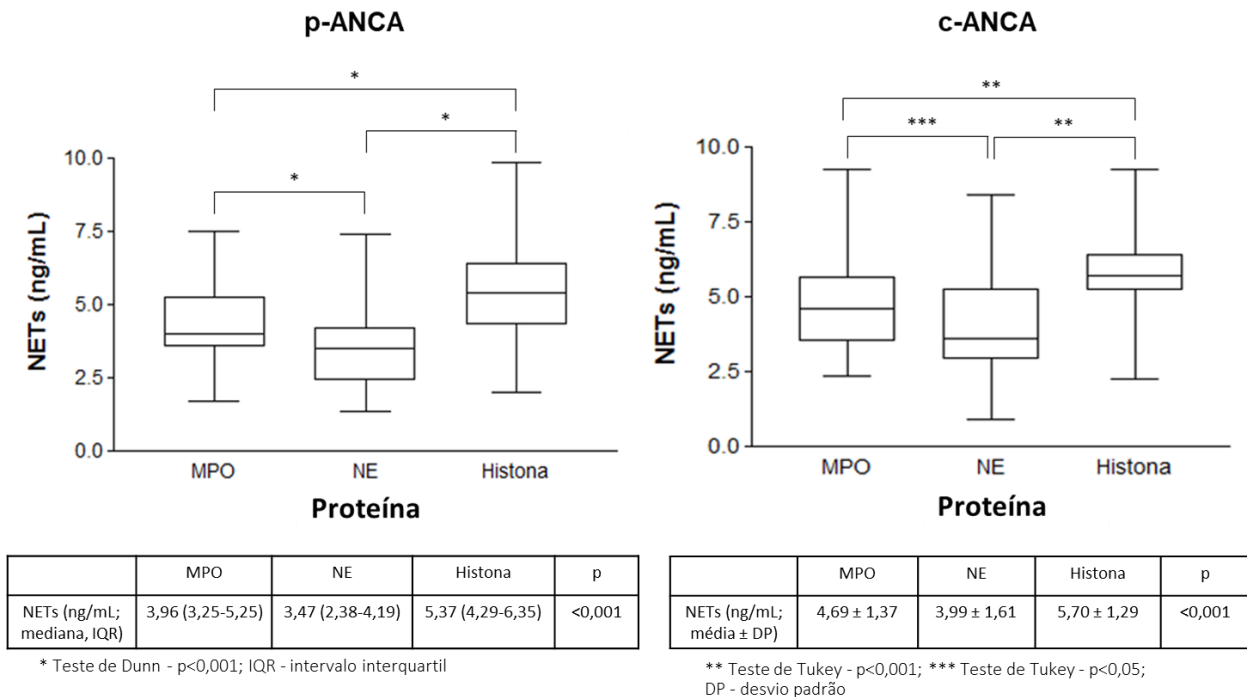


Figura 5. Comparação da dosagem de NET para todos os pacientes com positividade para p-ANCA (n=90) e c-ANCA (n=56), por proteínas detectadas no teste.

Ao avaliar a dosagem da NET, entre os grupos p-ANCA e c-ANCA, divididos por grupos de doenças, por proteína utilizada, foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas na dosagem por NE, sendo p<0,0001, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Comparação da dosagem da NET entre p-ANCA e c-ANCA, por grupos de doenças, com 3 proteínas

		Grupo I (n=63) (média ± DP)	Grupo II (n=52) (média ± DP)	Grupos III e IV (n=31) (média ± DP)	p*
p-ANCA (n=90)	MPO	4,42 ± 1,28	4,46 ± 1,14	4,27 ± 1,10	0,8070
	NE	3,36 ± 1,10	3,29 ± 1,18	4,27 ± 1,49	<0,0001
	Histona	5,51 ± 1,30	5,02 ± 1,69	5,76 ± 1,37	0,1420
c-ANCA (n=56)	MPO	4,51 ± 1,25	5,65 ± 1,66	4,70 ± 1,55	0,0971
	NE	4,06 ± 1,73	3,84 ± 1,35	3,67 ± 0,97	0,81315
	Histona	5,60 ± 1,45	6,06 ± 0,44	5,95 ± 0,53	0,5785

DP - Desvio padrão da média; MPO - Mieloperoxidase; NE - Elastase Neutrófila; *ANOVA.
Fonte: Autor.

Ao avaliar a dosagem da NET por NE, entre os indivíduos portadores de p-ANCA dos grupos I e II, considerados portadores de “Doenças Autoimunes”, versus os grupos III e IV, ou seja, os portadores de “Infecção ou Neoplasia”, foi encontrada diferença estatisticamente significativa com $p < 0,01$. Da mesma forma, ao comparar o grupo Doenças Autoimunes aos controles saudáveis e o Grupo Neoplasia/Infecção aos controles saudáveis, houve diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,001$ (Figura 6).

Na análise realizada entre os portadores de p-ANCA, através da NE entre o grupo I, ou seja, os portadores de VAA, versus os grupos III e IV, ou seja, os pacientes portadores de Infecções e Neoplasias, foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$. Além disso, houve diferença entre o grupo I versus controles saudáveis e grupos III e IV versus controles, com $p < 0,001$, como mostra a Figura 6.

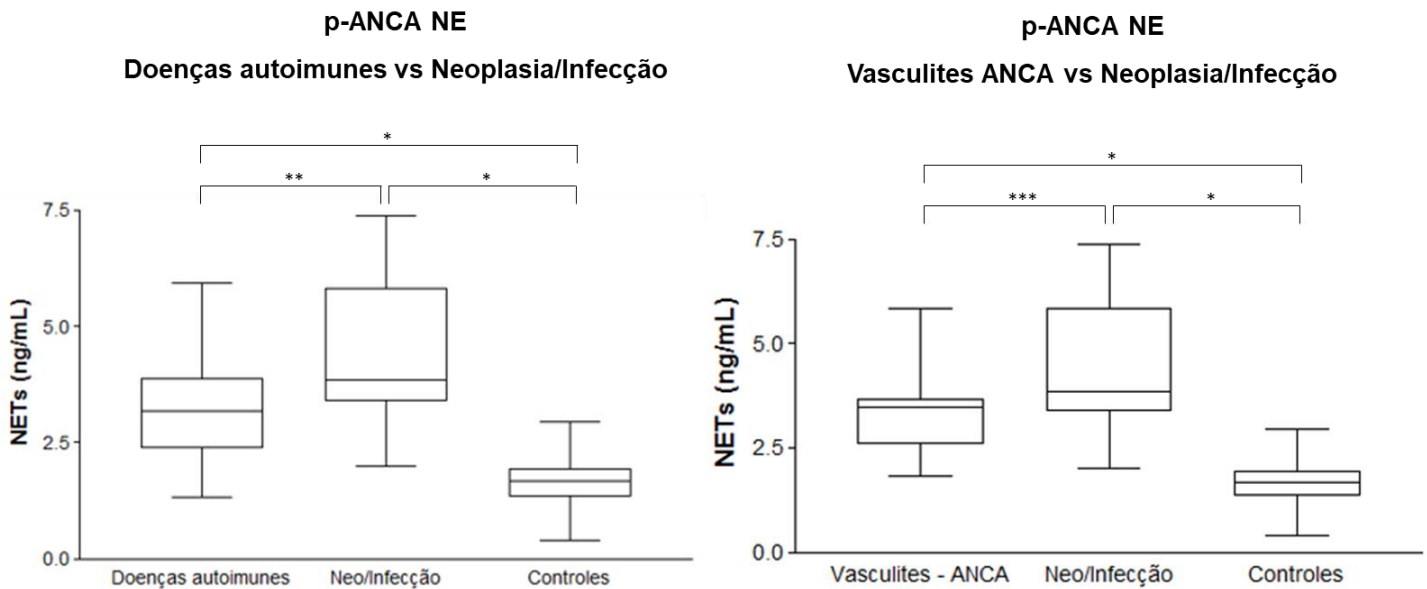


Figura 6. Comparação da dosagem de NET por elastase neutrofílica (NE) entre pacientes p-ANCA (n=90), divididos entre Doenças autoimunes vs Neoplasia/Infecção e controles e Vasculites ANCA vs Neoplasia/Infecção e controles.

*: teste de Tukey, $p < 0,001$. **: teste de Tukey, $p < 0,01$. ***: teste de Tukey, $p < 0,005$

Fonte: Autor.

A curva ROC para dosagem de NET por NE nos pacientes com p-ANCA, avaliando VAA vs controles, mostrou sensibilidade de 0,84 e especificidade de 0,88, com área sob a curva de 96%, sendo o melhor corte no valor de 2,2 ng/mL, como mostra a Figura 7.

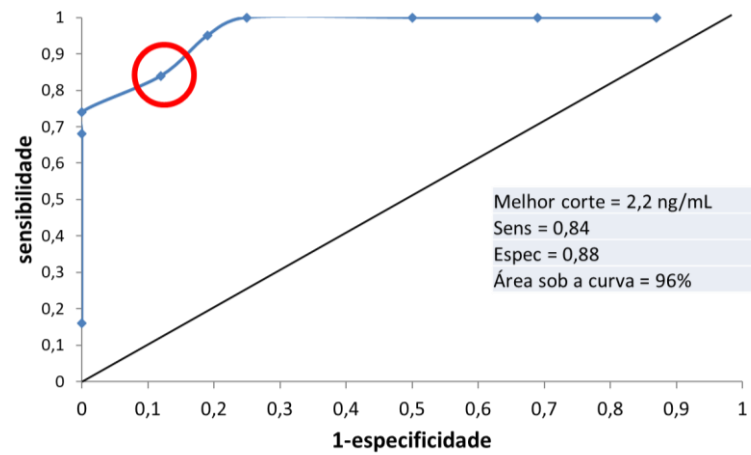


Figura 7. Curva ROC para dosagem de NET por NE nos pacientes com p-ANCA, avaliando VAA vs controles.
Fonte: Autor.

Já a curva ROC para dosagem de NET por NE nos pacientes com p-ANCA, avaliando Neoplasia/Infecção vs VAA, mostrou sensibilidade de 0,65 e especificidade de 0,84, com área sob a curva de 65%, sendo o melhor corte no valor de 3,7 ng/mL, como mostra a Figura 8.

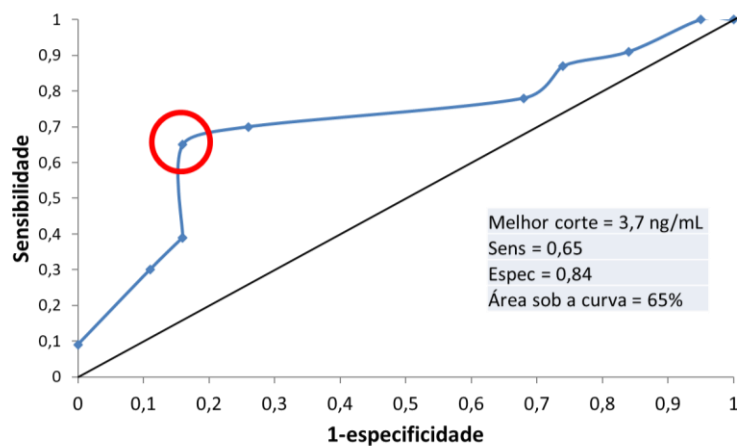


Figura 8. Curva ROC para dosagem de NET por NE nos pacientes com p-ANCA, avaliando Neoplasia/Infecção vs VAA.
Fonte: Autor.

6. DISCUSSÃO

Apresentamos os resultados de um estudo transversal, observacional, de avaliação de NETose no soro de indivíduos com exame positivo para ANCA por imunofluorescência indireta. Foram encontrados 129 pacientes com positividade do ANCA sem diagnóstico de VAA, sendo esses pacientes portadores de diversas doenças, a maioria autoimunes, mas também infecções e neoplasias. Dados da literatura mostram que o ANCA pode ser encontrado em outras situações, distintas das VAA, como doenças inflamatórias intestinais, colangite esclerosante primária, doenças inflamatórias hepáticas, fibrose cística, entre outras (BOSSUYT *et al.*, 2017).

Estudos mostram que nas doenças inflamatórias intestinais (DII) o p-ANCA é comumente encontrado em pacientes com retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC); porém este marcador sorológico não é específico para o quadro. O padrão de p-ANCA em pacientes com DII é o denominado p-ANCA atípico (BOUZID *et al.*, 2011). O teste sorológico de ANCA em combinação com o anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) é útil para distinguir pacientes com RCU de pacientes com DC. Sendo ambos mais encontrados em pacientes com DC e apenas o p-ANCA em RCU. No entanto, a presença de p-ANCA não é diagnóstica, nem está correlacionada com a atividade dessas doenças (MONIUSKO *et al.*, 2013).

No caso da fibrose cística, os pacientes geralmente desenvolvem ANCA contra outra proteína granular de neutrófilos, a proteína bactericida de aumento da permeabilidade (BPI) (MAHADEVA *et al.*, 1999). Os autoanticorpos anti-BPI mostram uma forte associação com colonização e infecção, particularmente por *Pseudomonas aeruginosa* nestes pacientes (LACHENAL *et al.*, 2009). Além disso, esses autoanticorpos estão correlacionados com a gravidade da doença (CARLSSON *et al.*, 2007).

A literatura mostra a presença do ANCA também em casos de vasculite induzida por drogas, principalmente por propiltiuracil, hidralazina e cocaína adulterada com levamisol. As manifestações clínicas desta vasculite variam de leves (ex. vasculite cutânea) a graves, como glomerulonefrite rapidamente progressiva e insuficiência renal. O padrão de coloração mais comumente encontrado nesta vasculite é o p-ANCA atípico, que pode ser contra NE humana, lactoferrina, BPI, azurocidina e catepsina G; mas p e c-ANCA podem ser detectados ocasionalmente (GRAU *et al.*, 2015).

Estudo conduzido na Itália identificou o ANCA contra NE humana como a especificidade de ANCA mais prevalente entre usuários de cocaína, sendo considerado um

marcador diagnóstico que diferencia lesões destrutivas da linha média induzidas por cocaína de vasculite primária associada ao ANCA, particularmente granulomatose com poliangiíte. Além disso, o grupo notou a presença do ANCA em três indivíduos previamente saudáveis que desenvolveram episódios recorrentes cíclicos de agranulocitose sintomática após exposição à cocaína e viram que o alvo desse subtipo de ANCA também era a NE (SCHIEPPATI *et al.*, 2018).

Um estudo de 1989 já chamava a atenção para as diferentes especificidades diagnósticas dos autoanticorpos para componentes distintos do citoplasma dos neutrófilos e propôs que o anti-NE poderia ser um marcador de envolvimento neurológico em alguns pacientes com LES (NÄSSBERGER *et al.*, 1989).

Um teste p-ANCA positivo pode ser causado também pela presença de anticorpos antinucleares (ANA), particularmente em pacientes com doenças autoimunes. (SUWANCHOTE *et al.*, 2018). Altos títulos de ANA podem ser confundidos com um p-ANCA, especialmente no lúpus eritematoso sistêmico, em que títulos elevados desses anticorpos são encontrados (RADICE *et al.*, 2005).

Savige mostrou que um ANA específico de granulócitos pode ocasionalmente ser confundido com o ANA ou p-ANCA de alto título. A maioria das especificidades do ANA são evidentes nos núcleos de neutrófilos fixados com etanol. Porém os soros com ANA são geralmente negativos em células fixadas em formalina, uma vez que a formalina desnatura a maioria dos antígenos nucleares. No entanto, os anticorpos anti-dsDNA podem persistir (SAVIGE *et al.*, 1998).

A associação entre infecções, formação de ANCA e vasculites mediadas por ANCA é conhecida há décadas. Os estudos experimentais e epidemiológicos forneceram fortes evidências de apoio ao conceito de que as infecções podem exacerbar as VAA e podem até ser o principal mecanismo patogênico da formação de ANCA. (KALLENBERG; TADEMA, 2008). A formação de ANCA foi relatada durante o curso de várias infecções crônicas de etiologia viral, bacteriana, fúngica, protozoária e parasitária multicelular (KONSTANTINOV *et al.*, 2013).

O ANCA associado à infecção pode ser desencadeado por disfunções imunes em resposta a peptídeos microbianos levando a: aumento da expressão de autoantígenos específicos, mimetismo molecular entre microorganismos patogênicos e autoantígenos, formação de NETs e interação de componentes de microorganismos patogênicos com receptores do tipo *Toll* (KONSTANTINOV *et al.*, 2015).

A associação entre neoplasias malignas e vasculites associadas ao ANCA é rara, tendo sido descrita com neoplasias sólidas e hemopatias malignas de origem linfóide ou mielóide. Em casos mais raros, uma neoplasia subjacente pode desencadear vasculite sistêmica (PHILIPPONNET *et al.*, 2016).

Ao avaliar o padrão do ANCA visto na IFI no nosso estudo foi encontrado um predomínio do padrão c-ANCA entre os pacientes portadores de VAA e do padrão p-ANCA nos demais grupos de doenças. Dentre o grupo c-ANCA havia 75% de pacientes portadores de VAA, contrastando com apenas 23,3% no grupo p-ANCA. Neste grupo, houve predomínio de pacientes dos demais diagnósticos (76,7%).

Estudos mostram que autoanticorpos específicos contra PR3 (relacionado ao padrão c-ANCA) e MPO (relacionado ao padrão p-ANCA) são encontrados em mais de 90% dos pacientes com VAA primária; sendo utilizados como ferramenta no diagnóstico (SÖDERBERG; SEGELMARK, 2016).

Metanálise recente avaliou o valor do teste ANCA por IFI e por ELISA de anticorpos PR3 e MPO para o diagnóstico de VAA. Tendo mostrado que o teste c-ANCA por IFI tem uma sensibilidade de 75,2% e uma especificidade de 98,4%. Para o imunoensaio do anticorpo PR3, a sensibilidade dependeu do método utilizado e variou de 79,8% a 86,6%, enquanto a especificidade variou de 96,8% a 98,3%. Tanto para o p-ANCA IFI quanto para o ELISA de anticorpo MPO (todos os métodos), a sensibilidade variou consideravelmente, mostrando valores agrupados de 46,3% e 58,1%, respectivamente, enquanto a respectiva especificidade agrupada foi de 91,4% e 95,6% (GUCHELAAR *et al.*, 2020).

O valor preditivo positivo do c-ANCA para o diagnóstico das VAA na amostra analisada foi de 75,9%; já o valor preditivo positivo do p-ANCA para as VAA foi de 21,6%.

No presente estudo, utilizamos 3 diferentes proteínas para a pesquisa da NETose no soro: MPO, histona e NE. As NETs podem ser dosadas através de diferentes antígenos proteicos e seu mecanismo de formação pode variar entre doenças distintas (VAN DAM *et al.*, 2019).

Não existe um método padrão ouro para medir NETs em tecidos ou fluidos corporais (PAUES *et al.*, 2018). Em amostras de órgãos, a microscopia confocal, que marca DNA e proteínas, como histonas e MPO, é a mais utilizada (PAUES *et al.*, 2018). Com base no fato de que as NETs são constituídas por diversas proteínas citoplasmáticas e não há consenso sobre a proteína preferida (MARTINOD *et al.*, 2023), testamos MPO, histona (H3) e NE para a captura de NETs séricas. Há um projeto de padronização da dosagem de NETs em andamento no Comitê Científico e de Padronização de Biologia Vasculiar da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia, em que se espera que leve a melhorias na sensibilidade e

especificidade da detecção e quantificação de NETs no sangue (MARTINOD *et al.*, 2023).

Em 2019, Van Dam *et al.* (2019) avaliaram a diferença na formação e na composição de NETs entre as VAA e LES, tendo encontrado diferença quantitativa entre a formação de NETs induzida por essas doenças e que isto foi associado a uma aparência morfológica e de composição proteica diferente. Nas VAA, grandes áreas de DNA com trechos de DNA interconectados foram observados, enquanto no LES, pequenos grupos de neutrófilos foram tipicamente vistos ao redor do DNA extracelular. Viu-se também que as NETs induzidas por VAA foram significativamente ricas em histona 3 citrulinada (CitH3). Em contraste, as NETs induzidas por LES foram significativamente ricas em NE e continham exclusivamente a proteína cromossômica 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB-1) (VAN DAM *et al.*, 2019).

Este estudo de Van Dam *et al.* (2019) mostrou que a formação de NET em VAA e LES são processos doença-específicos, pois as NETs formadas em VAA e LES têm características distintas e dependem de processos intrinsecamente distintos, sugerindo assim um papel único das NETs em cada doença autoimune. Baseado nisso, poderíamos questionar se o reconhecimento da diversidade da formação de NETs em doenças autoimunes sistêmicas teria implicações na avaliação de NETs como biomarcador para diagnóstico diferencial e, eventualmente, um potencial alvo terapêutico (VAN DAM *et al.*, 2019).

A formação desregulada de NETs está implicada em várias condições clínicas, como sepse, doenças autoimunes, trombose e neoplasias. As NETs contêm proteínas pró-inflamatórias que, acredita-se, contribuam diretamente para a inflamação dos vasos nas VAA, danificando as células endoteliais e ativando o sistema complemento (SÖDERBERG *et al.*, 2015).

Dependendo do contexto fisiopatológico de cada doença, as NETs são compostas por proteínas bioativas distintas que podem ser responsáveis pelo diferencial na patogênese e fenótipo da doença. Embora os neutrófilos possam estar ausentes em locais de inflamação crônica, remanescentes de NETs podem amplificar a resposta inflamatória além de seu curto período de vida nos tecidos (FRANGO *et al.*, 2019).

Vale ressaltar também que as NETs foram descritas inicialmente em doenças infecciosas, depois em outras causas de inflamação sistêmica e relacionadas à trombose e à progressão do câncer (HUANG *et al.*, 2022). Não surpreendentemente, encontramos níveis elevados de NETs em pacientes com infecções crônicas ativas e neoplasia.

Kraaij *et al.* (2018) mostraram formação excessiva de NETs em amostras pareadas de 10 pacientes com VAA em atividade, sendo significativamente menor quando a doença estava em remissão, sugerindo formação excessiva de NETs associada à atividade clínica da doença.

Além disso, no momento da hospitalização de pacientes com VAA, observou-se excessiva formação de NETs naqueles admitidos por recorrência da doença quando comparados a pacientes internados por infecção grave. Avaliados em conjunto, observou-se que a formação excessiva de NETs se associou à atividade clínica das VAA e possivelmente distinguiu atividade de doença de intercorrência infecciosa aguda (KRAAIJ *et al.*, 2018).

Ao avaliar a dosagem de NETs entre todos os pacientes e separadamente por grupos de doenças e controles saudáveis, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as proteínas utilizadas no teste. Da mesma forma, houve diferença significativa ao comparar a quantificação das NETs por proteína utilizada, entre grupos c-ANCA e p-ANCA. Destacamos a análise por grupos de doenças, em que foi encontrada diferença significativa na quantificação por NE.

Ao avaliar a quantificação de NETs por NE dos indivíduos portadores de p-ANCA dos grupos de “Doenças Autoimunes” versus dos portadores de “Infecção ou Neoplasia”, foi encontrada diferença significativa. Da mesma forma, ao serem comparados com os valores obtidos para os controles saudáveis. Embora o número de quantificações tenha sido reduzido após subdivisões em grupos, podemos supor que quantificar NETs através da detecção de NE seja um meio de distinguir três grupos de indivíduos: saudáveis, portadores de doenças autoimunes e portadores de infecção ou neoplasia. Além disso, com base nos nossos dados, poderíamos levantar a questão se este diferente conteúdo proteico nas NETs de indivíduos com infecções crônicas ou doenças neoplásicas está relacionado com a fisiopatologia do dano tecidual nestas doenças.

A NE, assim como a proteína arginina deiminase 4 (PAD4) e fosfolípidios oxidados, estão envolvidos no processo de descondensação da cromatina, ingurgitamento nuclear e a subsequente liberação do conteúdo nuclear. A descondensação da cromatina é um pré-requisito para a formação efetiva de NETs (TOKUHIRO *et al.*, 2021).

Um estudo desenvolvido em camundongos com modelo de infecção viral mostrou ativação da NE e NETose, levando a vasculopatia e interrupção sustentada das redes neurovasculares no cérebro em maturação. Demonstrou também que a inibição da atividade proteolítica da NE limitava significativamente a neuroinflamação, extravazamentos neurovasculares e distorções neurovasculares de longo prazo; o que revela uma nova abordagem terapêutica potencial focada na NE, com intuito de prevenir arteriopatias infantis e abrandar a suscetibilidade do cérebro juvenil ao acidente vascular cerebral isquêmico na infância (RAYASAM *et al.*, 2021).

Ao analisarmos a curva ROC para dosagem de NETs por NE nos pacientes com p-

ANCA, considerando VAA vs controles; a sensibilidade foi de 84% e especificidade de 88%, com área sob a curva de 96%, sendo o melhor corte no valor de 2,2 ng/mL. Ao avaliar a curva ROC para dosagem de NETs por NE nos pacientes com p-ANCA considerando Neoplasia/Infecção vs VAA, houve sensibilidade de 65% e especificidade de 84%, com área sob a curva de 65%, sendo o melhor corte no valor de 3,7 ng/mL. O que reforça a suposição de que a quantificação da NETs através da NE seria uma ferramenta no auxílio ao diagnóstico diferencial entre indivíduos, principalmente na distinção VAA vs saudáveis. Não foram encontrados dados na literatura de estudos semelhantes para fins de comparação.

Mais estudos são necessários para corroborar tais achados e para testar outras modalidades de dosagem de NETs, a partir de diferentes proteínas citoplasmáticas, com o intuito de considerar a dosagem de NETs como auxílio no diagnóstico diferencial de doenças que se assemelham em suas manifestações clínicas, sendo caracterizadas muitas vezes, como desafio diagnóstico, como as vasculites, infecções e neoplasias.

Como a NETose parece ativa em várias condições autoimunes caracterizadas por diferentes perfis de autoanticorpos, é provável que diferentes proteínas das NETs e modificações pós-traducionais estejam ativas durante a NETose. Um grande esforço tem sido feito para caracterizar todos os componentes de NETs em diferentes doenças autoimunes por proteômica e correlacionar os novos achados com dados clínicos (BRUSCHI *et al.*, 2017).

A capacidade de detectar NETs pode ser usada como uma ferramenta prognóstica para pacientes com condições que apresentam uma taxa mais alta de formação de NETs, facilitando aos médicos o fornecimento de tratamento personalizado. Para que as NETs sejam usadas como ferramentas de triagem, deve haver estudos para padronizar e definir níveis normais e anormais. Isso pode envolver a medição de produtos associados a NETs no sangue, como DNA livre celular, citH3, NE e MPO (MUTUA; GERSHWIN, 2021).

Um estudo chinês de 2016, analisou as associações entre os níveis circulantes de NETs com parâmetros clínico-patológicos em pacientes portadores de VAA. Os níveis séricos de NETs em pacientes com VAA ativa foram significativamente maiores do que aqueles em controles saudáveis, e o nível de DNA livre celular correlacionado com a proteína C-reativa (PCR). No entanto, não foi encontrada correlação entre o nível de complexos MPO-DNA ou de complexos cit-H3-DNA e PCR. Também não houve correlação significativa entre o nível de NETs e creatinina sérica inicial, taxa de filtração glomerular estimada (eTFG), formação de crescentes ou *Birmingham Vasculitis Activity Score* (BVAS). Além disso, não houve diferença significativa dos níveis séricos de DNA livre celular ou complexos MPO-DNA entre o estágio ativo e a remissão da VAA. Concluíram que os níveis circulantes de NETs não podem ser

usados como biomarcador para avaliar a atividade da doença em pacientes com VAA (WANG *et al.*, 2016).

No contexto das neoplasias, Cools-Lartigue *et al.* (2014) mostraram que os mecanismos subjacentes ao papel pró-metastático das NETs podem ser múltiplos. Ao constatar que fatores elaborados pelos neutrófilos, como matriz metaloproteinase 9 (MMP-9), catepsina G e NE, podem apoiar o desenvolvimento de tumores, desde a adesão precoce, proliferação e invasão até a angiogênese. Muitos desses fatores foram demonstrados dentro das NETs; as quais podem gerar um microambiente para a célula tumoral presa, rico em proteínas e enzimas que facilitam sua progressão; ao sequestrar células tumorais e aproximá-las de uma série de fatores derivados de neutrófilos, os quais demonstraram papéis em vários estágios da cascata metastática. Isso não apenas apresenta as NETs como potencial biomarcador, mas também como um potencial alvo terapêutico (COOLS-LARTIGUE *et al.*, 2014).

A importância do tema estudado é evidenciada por diversos estudos mostrando a ligação entre NETs e patogênese de várias doenças, incluindo sepse, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, vasculite de pequenos vasos, doença inflamatória intestinal, câncer, COVID-19 e outras. Por isso, conhecer o processo e os produtos da NETose é fundamental para o tratamento de doenças relacionadas a ela. Pesquisadores têm descoberto que vários inibidores de NETose, como inibidores de receptores tipo Toll, *scavengers* e de espécies reativas de oxigênio, podem impedir o desenvolvimento descontrolado de NETs (HUANG *et al.*, 2022).

Dependendo do tipo de estímulo, as NETs são liberadas por diferentes vias. Embora os detalhes e mecanismos das doenças associadas às NETs não sejam totalmente compreendidos, o conhecimento de etapas e produtos específicos de NETose pode oferecer benefícios terapêuticos nestas doenças. Vários medicamentos direcionados a diferentes etapas da formação das NETs foram relatados, incluindo cloro-amidina, hidroxicloroquina, cloreto de difenilenoiodônio, N-acetilcisteína, DNase I humana recombinante, vitamina D, antibióticos, como azitromicina, cloranfenicol e gentamicina, entre outros (HUANG *et al.*, 2022).

Mais estudos são recomendados para revelar as conexões detalhadas entre NETose e suas doenças relacionadas; além de identificar estratégias para modular efetivamente a NETose desregulada (HUANG *et al.*, 2022).

As formulações de drogas inibidoras de NETs ou enzimas envolvidas com efeitos colaterais mínimos podem ser úteis no tratamento de várias doenças associadas à NETose. Mais estudos e compreensão da regulação e equilíbrio da indução, inibição e degradação de NETs usando inibidores de NETose serão necessários, para que não haja comprometimento das defesas imunológicas do paciente. Para aplicação deste tipo de tratamento na prática, são

necessárias mais investigações a fim de compreender com precisão as funções e efeitos das NETs na saúde e na doença em relação aos padrões heterogêneos de cada doença (CHAMARDANI; AMIRITAVASSOLI, 2022).

Nosso estudo possui algumas limitações, como o número reduzido de pacientes quando da divisão em subgrupos, mais evidente nos grupos doenças infecciosas e neoplásicas, além da falta de quantificação sérica de PR3, MPO e NE, bem como de anticorpos específicos para essas proteínas em todos os grupos.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo produziu evidências de que a quantificação de NETs através da detecção de NE pode ser um meio de distinguir pacientes portadores de doenças autoimunes, de infecções ou de neoplasias e indivíduos saudáveis. Os resultados não esgotam essa complexa temática, mas contribuem para subsidiar a reflexão de se o reconhecimento da diversidade da formação de NETs nos diversos grupos de doenças teria implicações como biomarcador para diagnóstico diferencial e, eventualmente, potencial alvo terapêutico.

REFERÊNCIAS

- BOSSUYT, X Serologic markers in inflammatory bowel disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 171–181, 2006.
- BOSSUYT, X *et al.* Revised 2017 international consensus on testing of ANCA in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 11, p. 683–692, 2017.
- BOUZID, D *et al.* Contribution of immunofluorescence to identification and characterization of antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 5, p. 229-232, 2011.
- BRINKMANN, V *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.
- BRUSCHI, M *et al.* Post-translational modified proteins are biomarkers of autoimmune-processes: NETosis and the inflammatory–autoimmunity connection, **Clinica Chimica Acta**, v. 464, p. 12-16, 2017.
- CARLSSON, M *et al.* Autoantibody response to BPI predict disease severity and outcome in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 6, n. 3, p. 228-233, 2007.
- CHAMARDANI, T. M.; AMIRITAVASSOLI, S. Inhibition of NETosis for treatment purposes: friend or foe? **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 477, n. 3, p. 673-688, 2022.
- COOLS-LARTIGUE, J *et al.* Neutrophil extracellular traps in cancer progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 71, n. 21, p. 4179-4194, 2014.
- CSERNOK, E.; MOOSIG, F. Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 8, p. 494–501, 2014.
- DAMOISEAUX, J *et al.* Detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): A multicentre European Vasculitis Study Group (EUVAS) evaluation of the value of indirect immunofluorescence (IIF) versus antigen-specific immunoassays. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 4, p. 647–653, 2017.
- DAVIES, D. J *et al.* Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology? **British Medical Journal**, v. 285, n. 6342, p. 606, 1982.
- FRANGOU, E *et al.* An emerging role of neutrophils and NETosis in chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus (SLE) and ANCA-associated vasculitides (AAV): Implications for the pathogenesis and treatment. **Autoimmunity Reviews**, v. 18, n. 8, p. 751–760, 2019.
- GRAU, R. G. Drug-induced vasculitis: new insights and a changing lineup of suspects. **Current rheumatology reports**, v. 17, n. 12, p. 1-10, 2015.
- GUCHELAAR, N. A. D *et al.* The value of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)

testing for the diagnosis of ANCA-associated vasculitis, a systematic review and meta-analysis. **Autoimmunity Reviews**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2020.

HOCHBERG, M.C *et al.* **Rheumatology**. 7th. ed. Philadelphia: Elsevier, 2019.

HUANG, J *et al.* Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. **MedComm**. v, 19, n. 3, p. 1-19, 2022.

KALLENBERG, C. G. M.; TADEMA, H. Vasculitis and infections: contribution to the issue of autoimmunity reviews devoted to “autoimmunity and infection”. **Autoimmunity reviews**, v. 8, n. 1, p. 29-32, 2008.

KONSTANTINOV, K. N.; ULFF-MØLLER, C. J.; TZAMALOUKAS, A. H. Infections and antineutrophil cytoplasmic antibodies: triggering mechanisms. **Autoimmunity reviews**, v. 14, n. 3, p. 201-203, 2015.

KONSTANTINOV, K. N *et al.* Glomerular disease in patients with infectious processes developing antineutrophil cytoplasmic antibodies. **International Scholarly Research Notices Nephrol**, v. 19, p. 1-18, 2013.

KRAAIJ, T *et al.* Excessive neutrophil extracellular trap formation in ANCA-associated vasculitis is independent of ANCA. **Kidney International**, v. 94, n. 1, p. 139–149, 2018.

LACHENAL, F *et al.* Prevalence and clinical significance of auto-antibodies in adults with cystic fibrosis. **European Respiratory Journal**, v. 34, n. 5, p. 1079-1085, 2009.

LEE, K. H *et al.* Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 11, p. 1160–1173, 2017.

LESVRE, P *et al.* Atypical autoantigen targets of perinuclear antineutrophil cytoplasm antibodies (P-ANCA): specificity and clinical associations. **Journal of Autoimmunity**, v. 6, n. 2, p. 185-195, 1993.

MAHADEVA, R *et al.* Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) against bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and cystic fibrosis lung disease. **Clinical and experimental immunology**, v. 117, n. 3, p. 561-567, 1999.

MARTINOD, K. International Society on Thrombosis and Haemostasis, Vascular Biology SSC Subcommittee Project: towards standardization of neutrophil extracellular trap (NET) measurements in patient samples, 2023. https://cdn.ymaws.com/www.isth.org/resource/resmgr/ssc/ssc_subcommittee_project_mar.pdf.

MILLET, A *et al.* Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides: Is it time to split up the group? **Postgraduate Medical Journal**, v. 90, n. 1063, p. 290–296, 2014.

MUTUA, V.; GERSHWIN, L.J. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. **Clin Rev Allergy Immunol**. v. 61, n. 2, p. 194-211, 2021

NÄSSBERGER, L *et al.* Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus. **The**

Lancet, v. 333, n. 8636, p. 509, 1989.

PAUES GÖRANSON, S. THÅLIN, C. LUNDSTRÖM, A. *et al.* Circulating H3C it is elevated in a human model of endotoxemia and can be detected bound to microvesicles. **Sci Rep** v. 8, n. 12641, 2018.

PHILIPPONNET, C *et al.* Antineutrophilic cytoplasmic antibody-associated vasculitis and malignant hemopathies, a retrospective study of 16 cases. **Joint Bone Spine**, v. 84, n. 1, p. 51–57, 2016.

RADICE, A.; SINICO, R. A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). **Autoimmunity**, v. 38, n. 1, p. 93-103, 2005.

RADU, A. R. I. S.; LEVI, M. Anticorpos contra neutrófilos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 31, n.1, p. 16–20, 2005.

RAYASAM, A *et al.* Viral mimetic triggers cerebral arteriopathy in juvenile brain via neutrophil elastase and NETosis. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v. 41, n. 12, p. 3171–3186, 2021.

SAVIGE, J. A *et al.* A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. **Journal of clinical pathology**, v. 51, n. 8, p. 568-575, 1998.

SAVIGE, J *et al.* International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). **American Journal of Clinical Pathology**, v. 111, n. 4, p. 507–513, 1999.

SCHIEPPATI, F *et al.* Acquired cyclic neutropenia associated with cocaine-induced anti-neutrophil cytoplasmic antibodies binding to human neutrophil elastase. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 9, p. 227-229, 2018.

SÖDERBERG, D *et al.* Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 54, n. 11, p. 2085–2094, 2015.

SÖDERBERG, D.; SEGELMARK, M. Neutrophil extracellular traps in ANCA-associated vasculitis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JUN, p. 1–9, 2016.

SUWANCHOTE, S *et al.* Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and their clinical significance. **Clinical Rheumatology**, v. 37, n. 4, p. 875-884, 2018.

TOKUHIRO, T *et al.* Oxidized Phospholipids and Neutrophil Elastase Coordinately Play Critical Roles in NET Formation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 9, n. 9, p. 1-17, 2021.

VAN DAM, L. S *et al.* Intrinsically Distinct Role of Neutrophil Extracellular Trap Formation in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Compared to Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheumatol**, v. 71, n 12, p. 2047–2058, 2019.

WANG, H *et al.* *Circulating* Level of Neutrophil Extracellular Traps Is Not a Useful Biomarker for Assessing Disease Activity in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1-10, 2016.

APÊNDICE

Apêndice A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Nome da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE NETose EM INDIVÍDUOS COM RESULTADOS VERDADEIRO E FALSO POSITIVOS PARA ANCA.

Pesquisadores responsáveis: Pâmella Indira da Silva Oliveira Menezes e Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira.

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar deste projeto de pesquisa. Esse convite está sendo feito a vários pacientes que, como você, tem exame positivo para o Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA). Estamos estudando a relação deste Anticorpo com as doenças reumáticas e com outras doenças, como infecções e alguns tipos de câncer. Para isso, faremos a dosagem de NETs no sangue. NET é o nome dado a uma alteração das células brancas normais de defesa presentes no sangue de todas as pessoas. Essa alteração pode ajudar os médicos a diagnosticar com mais clareza a doença que cada paciente tem.

A participação é VOLUNTÁRIA. Para participar, é necessário ler atentamente esse documento e ouvir nossas explicações para que não restem dúvidas. Se, após as explicações, você tiver interesse em participar, solicitaremos que assine este documento.

Caso aceite participar do estudo, iremos utilizar uma pequena quantidade do seu sangue (2 mL) que já foi colhido para a realização do exame acima (ANCA), conforme indicação da equipe médica que o(a) atendeu. Neste líquido avaliaremos as NETs, como relatado acima.

Como utilizaremos o sangue que já foi colhido, você não será submetido(a) a nenhum procedimento adicional. Por isso, essa pesquisa não lhe trará qualquer risco ou prejuízo físico. Por outro lado, participar da pesquisa também não trará benefícios para seu tratamento.

Além da amostra de sangue, poderá haver consulta ao seu prontuário eletrônico, com intuito de avaliar dados clínicos e laboratoriais relatados pela Equipe assistente. Com isso, há um risco mínimo referente à quebra de sigilo das informações contidas no prontuário. Porém medidas serão tomadas para minimizar esse risco em todas as fases da pesquisa, como o controle do acesso aos dados do seu prontuário eletrônico por meio de senha pessoal e apenas pelos pesquisadores responsáveis.

Gostaria de enfatizar que você está sendo CONVIDADO(A), e a participação na pesquisa é completamente VOLUNTÁRIA. Você pode se negar a participar dessa pesquisa e isso não trará qualquer prejuízo para seu tratamento pela equipe assistente. Ou seja, você continuará com seu seguimento médico contínuo e gratuito, independente da participação no estudo. Os dados coletados

serão mantidos sob sigilo médico e serão utilizados apenas para fins de pesquisa. É garantida indenização caso o(a) senhor(a) tenha algum dano decorrente da pesquisa.

O estudo será feito no Laboratório de Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Em caso de dúvida, o contato poderá ser feito a qualquer um dos dois pesquisadores responsáveis (celulares da Dra Pâmella: 79 99812-2924 e do Dr Renê: 16 99196-9816 - disponíveis 24 horas), neste mesmo endereço ou pelo telefone (16) 3602-2717.

Caso você tenha sido devidamente orientado(a) quanto à proposta do estudo, como será a sua participação, bem como os riscos e benefícios, assine nas duas linhas abaixo. Além disso, este TCLE foi elaborado em duas vias, que devem ser assinadas e rubricadas em todas as suas páginas pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável.

“Eu, _____, no dia ____/____/____, concordo voluntariamente em participar deste estudo, sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou prejuízo no meu atendimento no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Declaro ainda que recebi uma via desse termo de consentimento devidamente assinada pelo pesquisador responsável.”

Assinatura do paciente ou responsável legal:

Nome do paciente ou responsável legal:

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha: _____

Nome da testemunha:

Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo:

Nome do responsável pelo estudo:

Data ____/____/____

Se houver alguma dúvida quanto à parte ética do projeto, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, localizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8:00 às 17:00hs, telefone de contato (016) 3602-2228.

Apêndice B. Ficha de coleta de dados.**FICHA PARA COLETA DE DADOS**

Nome: _____

Registro: _____

Idade: _____

Gênero: M F

Enfermaria/Ambulatório de origem: _____

Especialidade solicitante: _____

Tempo de sintomas até a solicitação do ANCA: _____

Sinais e sintomas que levaram à solicitação do ANCA: _____**Hipótese diagnóstica inicial:** _____Tabagista: SIM NÃOÓbito: SIM NÃO**ANCA (IFI):** C-ANCA P-ANCA**Diagnóstico final:** Vasculite Associada ao ANCA Outra doença autoimune (reumática, inflamatória intestinal, hepática, etc) Doença infecciosa Doença neoplásica Outra: _____**EXAMES LABORATORIAIS:**

EXAMES	Resultados
Hb	
Leucócitos	
Neutrófilos	

Linfócitos	
Eosinófilos	
Plaquetas	
VHS	
PCR	