

**HENRIQUE AYRES MAYRINK GIARDINI**

**Polimorfismos do gene *SERPINA1*: associação a pior prognóstico  
em pacientes com vasculites ANCA-associadas em uma coorte  
prospectiva multiétnica brasileira**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**SÃO PAULO**

**2023**

**HENRIQUE AYRES MAYRINK GIARDINI**

**Polimorfismos do gene *SERPINA1*: associação a pior prognóstico  
em pacientes com vasculites ANCA-associadas em uma coorte  
prospectiva multiétnica brasileira**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientadores: Prof. Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**SÃO PAULO**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Giardini, Henrique Ayres Mayrink

Polimorfismos do gene SERPINAL : associação a  
pior prognóstico em pacientes com vasculites ANCA-  
associadas em uma coorte prospectiva multiétnica  
brasileira / Henrique Ayres Mayrink Giardini. --  
São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema  
Musculoesquelético.

Orientador: Samuel Katsuyuki Shinjo.

Descritores: 1.Genética 2.Polimorfismo  
3.Mortalidade 4.Vasculite associada a anticorpo  
anticitoplasma de neutrófilos 5.Alfa-1-antitripsina  
6.Proteinase 3 de neutrófilos

USP/FM/DBD-028/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**Nome:** GIARDINI, Henrique Ayres Mayrink

**Título:** Polimorfismos do gene *SERPINA1*: associação a pior prognóstico em pacientes com vasculites ANCA-associadas em uma coorte prospectiva multiétnica brasileira

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

**Aprovado em:**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese à minha querida avó Maria da Glória Pinto Mayrink, ou vó Glorinha, meu anjo da guarda e melhor amiga, que infelizmente nos deixou em 2021.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à todas as pessoas que foram importantes de alguma forma para a minha formação, desde a infância:

À minha família, em especial meus pais Geraldo e Denyse, e minha avó Glorinha (*in memoriam*), pois me forneceram apoio emocional e financeiro mesmo em tempos difíceis.

Aos meus professores do ensino básico, fundamental, médio e superior, todos de instituições públicas, por terem compartilhado seus conhecimentos técnicos e de vida da melhor forma que podiam, mesmo vivendo em um país onde a educação pública é tão pouco valorizada.

Aos colegas médicos assistentes das residências de Clínica Médica e Reumatologia, por terem me consolidado como profissional.

Aos pacientes, base principal desta pesquisa, para quais espero poder retribuir com um pouco mais de conhecimento a respeito de suas enfermidades.

À bióloga Valéria de Falco Caparbo, que me orientou dentro do laboratório, e ao longo do processo se tornou minha amiga.

Aos meus orientadores, os professores Rosa Maria Rodrigues Pereira (*in memoriam*) e Samuel Katsuyuki Shinjo, por iluminarem este caminho e permitirem que este sonho se tornasse realidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

GIARDINI HAM. Polimorfismos do gene *SERPINA1*: associação a pior prognóstico em pacientes com vasculites ANCA-associadas em uma coorte prospectiva multiétnica brasileira [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução:** Polimorfismos do gene *SERPINA1*, que codifica a enzima alfa-1-antitripsina (A1AT), e do gene *PRTN3*, que codifica a enzima proteinase-3 (PR3), foram associados às vasculites ANCA-associadas (VAA) em estudos de *Genome-wide association (GWAS)* de pacientes brancos. Entretanto, a relação entre estes polimorfismos e as VAA na população multiétnica brasileira ainda é desconhecida.

**Objetivos:** Avaliar a associação entre *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) dos genes *SERPINA1* e *PRTN3* com as VAA em uma coorte multiétnica de pacientes brasileiros, e avaliar também a associação entre esses SNPs e classificação da doença, positividade do ANCA, concentrações séricas de A1AT, manifestações clínicas, dano e mortalidade. **Métodos:** Trata-se um estudo de caso-controle e coorte prospectivo que incluiu 115 pacientes com VAA (*2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides* e *2007 European Medicines Agency Algorithm for Classification of Vasculitis*) e 608 controles saudáveis, no período de junho de 2018 a julho de 2020. Os SNPs rs7151526 e rs28929474 do gene *SERPINA1* e rs62132295 do gene *PRTN3* foram identificados utilizando a técnica de *real time PCR*. A presença dos ANCA foi avaliada pelos métodos de imunofluorescência indireta e ELISA (anti-PR3 vs. anti-MPO). As concentrações séricas de A1AT foram avaliadas pelo método imunoturbidimétrico. **Resultados:** Avaliamos 115 pacientes (65,2% granulomatose com poliangiite, 17,4% granulomatose eosinofílica com poliangiite, 17,4% poliangiite microscópica) e 608 controles. O rs7151526 foi mais frequente em pacientes em homozigose (1,7% vs. 0,2%,  $p=0,045$ ) e o rs28929474 foi mais frequente em pacientes tanto em heterozigose (6,1% vs. 1,3%,  $p<0,0001$ ) quanto em homozigose (1,7% vs. 0%,  $p<0,0001$ ) do que nos controles. Na subanálise de indivíduos pretos, os rs7151526 e

rs28929454 foram mais frequentes em pacientes em heterozigose (9,6% vs. 3,8%,  $p=0,0035$ ; 7,7% vs. 0,5%,  $p<0,0001$ , respectivamente) e homozigose (3,8% vs. 0,0%,  $p=0,0035$ ; 3,8% vs. 0%,  $p<0,0001$ , respectivamente) do que nos controles. Os portadores desses SNPs tiveram uma sobrevida média menor [rs28929474: 54,9 (40,9-68,9) anos; rs7151526: 57,4 (42,7-72,1) anos] do que não portadores [68,0 (67,2-69,0) anos,  $p<0,0001$ ]. A associação entre esses SNPs foi o principal preditor de mortalidade (HR=6,2, IC95%=1,4-27,1,  $p=0,015$ ). Não foi possível verificar associação entre o rs62132295 e o diagnóstico de VAA em nossa coorte.

**Conclusões:** Nosso estudo é o primeiro a demonstrar a associação entre SNPs do gene *SERPINA1* e o diagnóstico de VAA em uma coorte multiétnica brasileira. A presença destes SNPs também se associou a uma menor sobrevida entre os pacientes com VAA nesta coorte.

**Descritores:** Genética. Polimorfismo. Mortalidade. Vasculite Associada a ANCA. alfa1-Antitripsina. Proteinase 3 de Neutrófilos



## ABSTRACT

GIARDINI HAM. *SERPINA1* gene polymorphisms: association with worse prognosis in patients with ANCA-associated vasculitis in a Brazilian multiethnic prospective cohort [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023

**Introduction:** Polymorphisms of the *SERPINA1* gene, which encodes the alpha-1-antitrypsin enzyme (A1AT), and the *PRTN3* gene, which encodes the proteinase-3 enzyme (PR3), have been associated with ANCA-associated vasculitis (AAV) in *Genome-wide association studies* (GWAS) of white patients. However, the relationship between these polymorphisms and AAV in the Brazilian multiethnic population remains unknown. **Objectives:** To evaluate the association between *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) of the *SERPINA1* and *PRTN3* genes and the diagnosis of AAV in a multiethnic cohort of Brazilian patients and to evaluate the association between these SNPs and disease classification, ANCA positivity, serum A1AT levels, clinical manifestations, damage, and mortality. **Methods:** This was a case-control and prospective cohort study that included 115 patients with AAV (*2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides* and *2007 European Medicines Agency Algorithm for Classification of Vasculitis*) and 608 healthy controls, from June 2018 to July 2020. The *SERPINA1* SNPs rs7151526 and rs28929474 and *PRTN3* SNP rs62132295 were identified using real-time PCR. The presence of ANCAs was evaluated using the indirect immunofluorescence and ELISA (anti-PR3 vs. anti-MPO) methods. Serum A1AT levels were evaluated using an immunoturbidimetric method. **Results:** We evaluated 115 patients (65.2% granulomatosis with polyangiitis, 17.4% eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, 17.4% microscopic polyangiitis) and 608 controls. The rs7151526 was more frequent in patients in homozygosis (1.7% vs. 0.2%,  $p=0.045$ ) and rs28929474 was more frequent patients in heterozygosis (6.1% vs. 1.3%,  $p<0.0001$ ) and homozygosis (1.7% vs. 0%,  $p<0.0001$ ) than in controls. In the sub-analysis of black individuals, rs7151526 and rs28929454 were more frequent in patients in heterozygosis (9.6% vs. 3.8%,  $p=0.0035$ ; 7.7% vs. 0.5%,  $p<0.0001$ , respectively) and homozygosis (3.8% vs. 0%,  $p=0.0035$ ; 3.8% vs. 0%,  $p<0.0001$ , respectively) than in controls. Carriers of these SNPs had a lower mean survival [rs28929474: 54.9 (40.9-68.9) years; rs7151526: 57.4

(42.7-72.1) years] than non-carriers [68.0 (67.2-69.0) years,  $p < 0.0001$ ]. The association between these SNPs was the main predictor of mortality (HR=6.2, 95%CI=1.4-27.1,  $p=0.015$ ). We were unable to verify an association between rs62132295 and AAV diagnosis in our cohort. **Conclusions:** Our study is the first to demonstrate an association between *SERPINA1* SNPs and the AAV diagnosis in a Brazilian multiethnic sample. The presence of these SNPs was also associated with shorter survival among patients with AAV in this cohort.

**Descriptors:** Genetics. Polymorphism. Mortality. Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. alpha 1-Antitrypsin. Proteinase 3

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados descritivos (variáveis categóricas) do grupo de pacientes..... 300
- Tabela 2** - Dados descritivos (variáveis contínuas) do grupo de pacientes..... 333
- Tabela 3** - Análise comparativa entre paciente e controles: geral e por etnia ..... 344
- Tabela 4** - Comparação genotípica e alélica entre pacientes carreadores versus não carreadores dos polimorfismos de um único nucleotídeo ..... 377
- Tabela 5** - Concentração sérica de alfa-1-antitripsina de acordo com genótipo - SERPINA1 SNP rs28929474 (T)..... 388
- Tabela 6** - Concentração sérica de alfa-1-antitripsina de acordo com genótipo - SERPINA1 SNP rs7151526 (A) ..... 388
- Tabela 7** -Análise univariada: pacientes sobreviventes versus. não sobreviventes. 39
- Tabela 8** - Análise comparativa de sobrevida entre pacientes carreadores versus não carreadores dos polimorfismos de um único nucleotídeo dos genes *SERPINA1* (rs7151526 e rs28929474) e *PRTN3* (rs62132295)..... 400
- Tabela 9** - Modelo de risco proporcional de Cox: fator genético e comorbidades.. 411

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
A1AT	Alfa-1-antitripsina
ANCA	<i>Anti-neutrophil cytoplasmic antibody</i>
BVAS	<i>Birmingham vasculitis activity score</i>
DA1AT	Deficiência de alfa-1-antitripsina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DCV	Doença cardiovascular
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GEPA	Granulomatose eosinofílica com poliangiite
GPA	Granulomatose com poliangiite
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HWE	<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>
IFI	Imunofluorescência indireta
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MPO	Mieloperoxidase
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
PAM	Poliangiite microscópica
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PR3	Proteinase-3
ROC	<i>Receiver operating characteristic curve</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
VAA	Vasculites ANCA-associadas
VDI	<i>Vasculitis damage index</i>

# SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>155</b>
1.1. Epidemiologia .....	155
1.2. Principais manifestações clínicas .....	166
1.3. Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA).....	166
1.4. Formação dos ANCA.....	177
1.5. Genética das vasculites ANCA-associadas .....	188
1.5.1. Human leukocyte antigen (HLA) .....	188
1.5.2. Genes <i>SERPINA1</i> e <i>PRTN3</i> .....	19
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>222</b>
2.1. Objetivo primário .....	222
2.2. Objetivos secundários .....	222
<b>3.PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	<b>244</b>
3.1. Pacientes e controles .....	244
3.2. Parâmetros clínicos e laboratoriais .....	244
3.3. Análise de polimorfismos de um único nucleotídeo ou <i>single nucleotide polymorphism</i> .....	255
3.4. Análise estatística.....	255
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>288</b>
4.1. Pacientes <i>versus</i> . Controles.....	288
4.1.1 Gene <i>SERPINA1</i> .....	288
4.1.2. Gene <i>PRTN3</i> .....	288
4.2. Pacientes não carreadores <i>versus</i> . pacientes carreadores dos polimorfismos de um único nucleotídeo ou <i>single nucleotide polymorphism</i> .....	355
4.2.1. Gene <i>SERPINA1</i> .....	355
4.2.2. Gene <i>PRTN3</i> .....	355
4.2.3. Análise de sobrevida.....	366
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>433</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>488</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>500</b>
<b>8. ANEXO</b> .....	<b>577</b>



## 1. INTRODUÇÃO

As vasculites associadas aos anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (VAA) constituem um grupo de doenças autoimunes raras que levam à inflamação dos vasos sanguíneos de pequeno e médio calibre (JENNETTE et al., 2013). Além disso, os anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) são importantes marcadores diagnósticos e parecem ser de fundamental importância na fisiopatogênese dessas doenças (NAKAZAWA et al., 2019).

### 1.1. Epidemiologia

Três entidades principais constituem o grupo das VAA: granulomatose com poliangiite (GPA), poliangiite microscópica (PAM) e granulomatose eosinofílica com poliangiite (GEPA). Apesar de raras, a incidência e prevalência das VAAs parece estar aumentando nas últimas décadas, provavelmente devido ao maior reconhecimento dessas doenças e maior disponibilidade da dosagem dos ANCA. A GPA é mais comum em populações de origem caucasiana, enquanto a PAM é mais comum em populações de origem asiática; a GEPA é em geral descrita como a VAA mais rara. A incidência destas doenças aumenta com a idade e homens são mais acometidos na maioria dos estudos (WATTS et al., 2015; WATTS et al., 2022).

Entretanto, BELEM et al. (2020) avaliaram 1233 pacientes com diagnóstico de vasculite sistêmica em acompanhamento em diversos centros de referência no Brasil e mostraram que, na população brasileira, GPA foi a VAA mais comum, seguida por GEPA, sendo PAM a mais rara de todas. Este estudo também demonstrou que a média de idade ao diagnóstico da GPA, GEPA e PAM no Brasil foi, respectivamente, de 41,9, 49,0 e 47,6 anos, e todas foram mais comuns no sexo feminino, em contradição ao que é descrito na maioria dos estudos internacionais.

Exposições ambientais e certos medicamentos podem ser fatores de risco ou gatilhos para desenvolvimento das VAA. Um exemplo clássico é o uso da medicação antitireoidiana propiltiouracil (NAKAZAWA et al., 2019). Uma meta-análise (GÓMEZ-PUERTA et al., 2013) de seis estudos retrospectivos mostrou associação das VAA com exposição à sílica, apesar da variabilidade dos estudos avaliados.

## 1.2. Principais manifestações clínicas

Sintomas constitucionais como febre, perda ponderal, mialgia, artralgia e artrite são comuns a todas as formas de VAA. Na GPA e PAM a vasculite necrosante de vasos de pequeno e médio calibre frequentemente leva à glomerulonefrite e capilarite pulmonar. Entretanto, na GPA, ocorre inflamação granulomatosa do trato respiratório superior e inferior (sinusopatia destrutiva, úlceras nasais e orais, perfuração de septo nasal, estenose traqueal e brônquica e nódulos pulmonares), manifestações que a distinguem da PAM. Eosinofilia e manifestações alérgicas (como asma, rinite, polipose nasal e sinusite) frequentemente precedem o início da GEPA por meses a anos, sendo estas manifestações bastante características (LAMPRECHT et al., 2018; NAKAZAWA et al., 2019). Pacientes com GEPA podem apresentar manifestações clínicas decorrentes da infiltração tecidual por eosinófilos, como miocardite e infiltrados pulmonares, bem como manifestações vasculíticas, como glomerulonefrite e mononeurite múltipla (TRIVIOLI et al., 2020).

Do ponto de vista histológico o achado clássico e que une todas as VAA é a vasculite pauci-imune. Diferente de outras vasculites que acometem predominantemente pequenos vasos, como a vasculite crioglobulinêmica e a vasculite por IgA, os estudos imuno-histoquímicos mostram pouca ou nenhuma deposição de imunocomplexos nas VAA (LAMPRECHT et al., 2018; NAKAZAWA et al., 2019). Uma possível explicação é a degradação dos ANCA pelas enzimas liberadas durante a formação das *neutrophil extracellular traps* (NET), que como veremos a seguir são mediadores importantes do dano vascular nestas doenças (NAKAZAWA et al., 2019). Necrose e fibrose tecidual complicam a evolução das VAA, que se não tratadas precoce e adequadamente evoluem com dano irreversível.

## 1.3. Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA)

Os ANCA são em sua maioria do subtipo IgG e direcionados contra enzimas presentes nos grânulos dos neutrófilos. Nas VAA duas enzimas alvos são reconhecidas: a proteinase 3 (PR3), com ação serino protease, e a mieloperoxidase (MPO), importante na formação das espécies reativas do oxigênio (CORNEC et al., 2016). Além de constituintes dos grânulos, a PR3 é expressa na membrana de



neutrófilos quiescentes e ativados, enquanto a MPO liberada de neutrófilos ativados pode se ligar à membrana dos neutrófilos vizinhos (CORNEC et al., 2016).

O método de imunofluorescência indireta permite a categorização dos ANCA em dois padrões principais: c-ANCA (padrão citoplasmático, mais associado à presença de anticorpos anti-PR3) e p-ANCA (padrão perinuclear, mais associado à presença de anticorpos anti-MPO). A especificidade dos ANCA pode ser estabelecida por técnicas antígeno-específicas, como *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Até 90% dos pacientes com GPA ou PAM apresentam positividade para o ANCA. O padrão c-ANCA/PR3-ANCA está mais associado à GPA e o padrão p-ANCA/MPO-ANCA à PAM, mas uma pequena proporção de pacientes com GPA e PAM, assim como a maioria dos pacientes com GEPA (até 60%), são ANCA negativos (SINICO et al. 2014; CORNEC et al., 2016).

Os novos critérios classificatórios do *American College of Rheumatology* (ACR) incluem a presença do c-ANCA/PR3-ANCA e p-ANCA/MPO-ANCA como os itens de maior peso para a classificação das VAA em GPA e PAM, respectivamente (SUPPIAH et al., 2012; ROBSON et al., 2022). A especificidade dos ANCA também apresenta implicações prognósticas e terapêuticas. O anti-PR3 está mais associado a presença de nódulos pulmonares, doença sinonasal e maior probabilidade de recidiva. Além disso, as VAA anti-PR3 positivas respondem melhor à terapia de indução com rituximabe em comparação a ciclofosfamida. Já a presença do anti-MPO está mais associada a glomerulonefrite, doença intersticial pulmonar, pior prognóstico renal com biópsia demonstrando lesões fibróticas e resposta similar a ciclofosfamida e rituximabe (SINICO et al. 2014; CORNEC et al., 2016). Pacientes com GEPA ANCA positivos apresentam mais manifestações vasculíticas (glomerulonefrite, neuropatia), maior risco de recidiva e respondem melhor ao rituximabe, enquanto aqueles que são ANCA negativos apresentam mais chance de miocardiopatia e pior prognóstico (COMARMOND et al., 2013; CORNEC et al., 2016).

#### **1.4. Formação dos ANCA**

A formação das NET tem importância fundamental na fisiopatologia das VAA. Durante um quadro infeccioso, por exemplo, em que há ativação da via T *helper* 17, são produzidas citocinas pró-inflamatórias e liberado o fragmento C5a pela ativação da via alternativa do complemento. Estes agentes se ligam a receptores na membrana

do neutrófilo levando a sua ativação. O neutrófilo ativado inicia então um processo de morte celular conhecido como NETosis, no qual a sua cromatina migra do núcleo ao citoplasma e se associa às enzimas dos grânulos. Esta combinação de cromatina e enzimas (dentre elas a MPO e a PR3) é então expulsa para o meio extracelular, onde formam uma estrutura em forma de teia com importante função na neutralização de micro-organismos. Apesar da ação microbicida sabe-se que as NET lesam as células endoteliais e, portanto, devem ser reabsorvidas. Esta função é realizada por macrófagos e uma importante enzima sérica chamada DNase I, capaz de degradar a cromatina das NET. Além disso, a alfa-1-antitripsina (A1AT) é a principal inibidora da enzima PR3, liberada para o meio extracelular durante o processo (PAPAYANNOPOULOS et al., 2018; SALAMA et al., 2018; NAKAZAWA et al., 2019).

Uma redução do *clearance* das NET pode levar em última instância a uma maior disponibilidade extracelular de cromatina e enzimas dos grânulos dos neutrófilos, como a MPO e PR3. Estas enzimas podem então ser processadas por células dendríticas e apresentadas via *major histocompatibility complex* (MHC) de classe II para os linfócitos T *helper*, com quebra da tolerância imunológica em indivíduos geneticamente predispostos. As células T levariam à ativação dos linfócitos B e produção de autoanticorpos, dando origem assim aos ANCA. Os ANCA, por sua vez, reconhecem e se ligam ao MPO e PR3 presentes na membrana celular dos neutrófilos pela porção Fab, enquanto a porção Fc se liga a receptores (FcγR), gerando ativação dos mesmos e ampliando o processo de NETosis num ciclo vicioso que culmina em inflamação persistente e dano vascular (PAPAYANNOPOULOS et al., 2018; SALAMA et al., 2018; NAKAZAWA et al., 2019).

Entretanto, a formação dos ANCA não explica todos os aspectos da fisiopatogênese das VAA, como a inflamação granulomatosa (T *helper* 1) na GPA e as manifestações alérgicas e infiltração eosinofílica (T *helper* 2) típicas da GEPA.

## **1.5. Genética das vasculites ANCA-associadas**

### **1.5.1. Human leukocyte antigen (HLA)**

As VAA são doenças poligênicas cuja fisiopatologia, embora ainda não totalmente elucidada, parece envolver a interação entre predisposição genética e fatores ambientais. Estudos genéticos mais recentes mostraram que GPA, PAM e

GEPA não representam manifestações distintas de uma mesma doença. Apesar de várias semelhanças clínicas e patológicas, essas condições apresentam características genéticas diferentes.

*Genome-wide association studies* (GWAS) que avaliaram populações de origem caucasiana identificaram que o *loci* gênico mais associado às VAA é o *human leukocyte antigen* (HLA). Nestes estudos os HLA-DPB1 e DPA1 foram os mais associados à GPA, e principalmente, à positividade do cANCA/anti-PR3, e os HLA-DQA2 e DQB1 à PAM e positividade do p-ANCA/anti-MPO (LYONS et al., 2012; XIE et al., 2013; ALBERICI et al., 2014; RAHMATTULLA et al., 2016; MERKEL et al., 2017; TRIVIOLI et al., 2022). Na população japonesa a presença do HLA-DRB1, que está em desequilíbrio de ligação com o HLA-DQB1, também mostrou associação com PAM e positividade do p-ANCA/anti-MPO (TSUCHIYA et al., 2013).

Com relação a GEPA estudos menores mostraram uma correlação positiva entre esta VAA e os HLA-DRB4 e DRB1 (VAGLIO et al., 2007; WIECZOREK et al., 2008). BOTTERO et al. (2014) mostrou que pacientes asmáticos HLA-DRB4 positivos apresentavam mais asma grave, rinosinusite crônica, polipose nasal e uso de glucocorticoide oral em relação aos HLA-DRB4 negativos, sugerindo a possibilidade de que estes pacientes possam representar uma fase prodrômica da doença. Mais recentemente, um GWAS avaliando apenas pacientes com GEPA demonstrou associação entre o HLA-DQ e positividade do MPO-ANCA (LYONS et al., 2019).

### **1.5.2. Genes *SERPINA1* e *PRTN3***

A PR3 é uma serina protease presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e é codificada pelo gene *PRTN3* localizado no cromossomo 19 (19p13.3). Ela é expressa na membrana celular dos neutrófilos, e o SNP rs62132295 do gene *PRTN3* parece levar a um aumento da expressão desta enzima. A principal inibidora natural da PR3 é a alfa-1-antitripsina (A1AT), codificada pelo gene *SERPINA1* localizado no cromossomo 14 (14q32.1) (BORGSMANN et al., 2001; ALBERICI et al., 2014; TRIVIOLI et al., 2022).

A presença do alelo Z (rs28929474) do gene *SERPINA1* em homozigose leva à deficiência de A1AT (DA1AT), doença marcada pelo aparecimento precoce de fibrose hepática e obstrução pulmonar (STRNAD et al., 2020). Também já foi demonstrado em populações de origem caucasiana uma maior frequência do alelo Z em pacientes

com GPA (ESNAULT et al., 1993; ELZOUKI et al., 1994; BASLUND et al., 1996; BORGMANN et al., 2001; TRIVIOLI et al., 2022).

Mais recentemente, dois *GWAS* confirmaram a associação entre polimorfismos do gene *SERPINA1* (rs28929474 e rs7151526) e *PRTN3* (rs62132295) com as VAA, em especial GPA e positividade do anticorpo anti-PR3, em populações de cor branca (LYONS et al., 2012; MERKEL et al., 2017). Nestes estudos os SNPs rs28929474 (alelo Z deficiente, causador da DA1AT) e rs7151526 estavam em desequilíbrio de ligação.

O alelo Z do gene *SERPINA1* está presente em 4% dos indivíduos de descendência europeia (STRNAD et al., 2020). A frequência deste alelo e a prevalência da DA1AT na população multiétnica brasileira é desconhecida. RUSSO et al. (2016) estudaram 926 pacientes brasileiros com doença pulmonar obstrutiva crônica e demonstraram que a prevalência de DA1AT foi de 2,8% nesta população; a frequência do alelo Z nos pacientes com DA1AT foi de 53,8%.

No entanto, até o presente momento, a relação entre os polimorfismos dos genes *SERPINA1* e *PRTN3* e as VAA na população multiétnica brasileira é desconhecida, o que nos motivou a realizar o presente estudo.



## **2.OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo primário**

O objetivo primário do estudo é avaliar a associação dos polimorfismos dos genes *SERPINA1* (rs7151526 e rs28929474) e *PRTN3* (rs62132295) com as VAAs em uma coorte multiétnica de pacientes brasileiros em comparação ao grupo controle.

### **2.2. Objetivos secundários**

Avaliar a associação entre a presença desses polimorfismos com a classificação da doença, *status* anti-MPO/PR3 e p-ANCA/c-ANCA, concentrações séricas de A1AT, manifestações clínicas, dano e mortalidade.

### **3. PACIENTES E MÉTODOS**

### **3. PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1. Pacientes e controles**

Foi realizado um estudo caso-controle e uma coorte prospectiva incluindo pacientes em acompanhamento nos setores de Reumatologia e Pneumologia do Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - São Paulo, com o diagnóstico de VAA realizado por reumatologista ou pneumologista de acordo com as manifestações clínicas, laboratoriais, achados histopatológicos e de imagem. Os pacientes foram classificados de acordo com *2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides* (JENNETTE et al., 2013) e o *2007 European Medicines Agency Algorithm for Classification of Vasculitis* (WATTS et al., 2007).

Utilizamos como grupo controle amostras de DNA previamente extraídos de 608 indivíduos saudáveis de 60 anos ou mais que participaram do estudo “The São Paulo Ageing & Health Study” (LOPES et al., 2011).

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de serem incluídos no estudo, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brasil (CAAE: 18393119.7.0000.0068).

#### **3.2. Parâmetros clínicos e laboratoriais**

Características individuais, como dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de imagem foram coletadas de todos os pacientes do estudo.

Para definição da etnia, os pacientes e controles foram questionados sobre a cor de pele dos avós paternos e maternos (FUCHS et al., 2002; LOPES et al., 2011). Pacientes e controles que relataram que todos os quatro avós eram brancos foram classificados como brancos. Aqueles que apresentavam pelo menos um dos avós de cor preta foram classificados como pretos. Para aqueles que não sabiam informar a cor dos avós, consideramos apenas a cor dos pais. Não foram incluídos, no estudo, pacientes ou controles de cor amarela.



Para quantificar atividade de doença e dano foram utilizados, respectivamente, os escores clínicos *Birmingham vasculitis activity score* (BVAS) (MUKHTYAR et al., 2009) e *Vasculitis damage index* (VDI) (EXLEY et al., 1997).

A presença dos ANCA foi avaliada pelo método de imunofluorescência indireta e pela dosagem de anticorpos anti-MPO e anti-PR3 pelo método ELISA (Inova Diagnostics, Werfen, Brazil). A dosagem de A1AT foi realizada pelo método imunoturbidimétrico e os resultados foram expressos em mg/dL.

### **3.3. Análise de polimorfismos de um único nucleotídeo ou *single nucleotide polymorphism***

Uma amostra de sangue periférico foi coletada de cada paciente no momento da inclusão no estudo. O DNA das amostras foi extraído de sangue total utilizando o Kit Qiagen (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemanha) específico para extração de DNA. Após a extração, as amostras foram armazenadas a - 20°C.

Os polimorfismos dos genes *SERPINA1* e *PRTN3* investigados foram escolhidos de acordo com os dois principais GWAS disponíveis na literatura (LYONS et al., 2012; MERKEL et al., 2017): *SERPINA1* rs7151526 e rs28929474 (alelo Z); e *PRTN3* rs62132295.

Os ensaios de genotipagem de SNP foram realizados utilizando sistema Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), empregando o equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

### **3.4. Análise estatística**

As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade pelos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilke determinadas como não paramétricas, por isso os valores contínuos e semicontínuos foram expressos em mediana (interquartil 25% - 75%). Os dados categóricos foram apresentados como valores absolutos (%) e foram analisados pelo teste de qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, quando necessário.

Os dados não paramétricos foram comparados usando o teste U de Mann-Whitney para duas amostras independentes ou teste de Kruskal-Wallis com um *post-hoc* de Müller-Dunn para três ou mais amostras.

A discriminação das variáveis contínuas e semi-contínuas foi realizada utilizando a curva operacional de resposta (ROC), através da área sob a curva e significância assintótica (distanciamento da curva da linha da nulidade). Além disso, as variáveis contínuas sem valor estabelecido de nota de corte referendada por três ou mais artigos internacionais foram categorizadas por meio da curva ROC. O ponto e nota de corte de cada variável foi determinado pelo maior valor da soma entre a sensibilidade e a especificidade em que corresponde ao ponto de maior inflexão da curva ROC.

A análise de sobrevida de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevida foram diferenciadas entre si através do teste de Log Rank e as expectativas de vida foram expressas através de média e erro padrão da estimativa.

A análise de regressão proporcional de Cox foi realizada considerando aquelas variáveis que possuíram valor de significância  $< 0,2$  pelo teste de Log-Rank na análise de sobrevida de Kaplan-Meier. Foram consideradas variáveis preditoras aquelas com valor de *hazard ratio* cujos valores inferiores e superiores dos intervalos de confiança não ultrapassassem a unidade e que fossem significantes ( $P < 0,05$ ).

Foi considerado para todo estudo risco  $\alpha \leq 0,05$  de cometer erro tipo I ou de 1ª espécie e risco  $\beta \leq 0,20$  de cometer erro tipo II ou de 2ª espécie.

As análises foram realizadas utilizando os programas SPSS 21.0 IBM® e GraphPad Prism 9.0 GraphPad®.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Pacientes *versus*. Controles

O estudo incluiu 115 pacientes, 75 (65,2%) com GPA, 20 (17,4%) com PAM e 20 (17,4%) com GEPA, sendo 37,4% do sexo feminino e 54,7% indivíduos de cor branca (**TABELAS 1 e 2**). O grupo controle foi composto por 608 indivíduos saudáveis, sendo 32,4% do sexo feminino e 65,5% indivíduos de cor branca.

#### 4.1.1 Gene *SERPINA1*

Os SNPs do gene *SERPINA1*, rs7151526 e rs28929474, estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) no grupo controle, com frequência alélica de 0,04 e 0,01, respectivamente, mas não no grupo de pacientes com VAA, ambos com frequência de 0,05. Estes SNPs também estavam em desequilíbrio de ligação em ambos os grupos (grupo controle: coeficiente de associação 0,34,  $P < 0,001$ ; grupo de pacientes: coeficiente de associação 0,88,  $P < 0,001$ ).

Quando comparamos todo o grupo de pacientes vs. o grupo controle (**TABELA 3**), o rs28929474 (alelo Z) foi mais frequente no grupo de pacientes tanto em heterozigose (6,1% vs. 1,3%,  $P < 0,0001$ ) quanto em homozigose (1,7% vs. 0%,  $P < 0,0001$ ). A frequência do rs7151526 em homozigose também foi mais frequente no grupo de pacientes (1,7% vs. 0,2%,  $P = 0,045$ ).

Quando realizamos a subanálise de pacientes e controles de acordo com a etnia (**TABELA 3**), verificamos que ambos SNPs foram mais frequentes em pacientes pretos do que nos controles pretos [rs28929454 em heterozigose (7,7% vs. 0,5%,  $P < 0,0001$ ) e homozigose (3,8% vs. 0,%,  $P < 0,0001$ ); rs7151526 em heterozigose (9,6% vs. 3,8%,  $P = 0,0035$ ) e em homozigose (3,8% vs. 0,0%,  $P = 0,0035$ )].

#### 4.1.2. Gene *PRTN3*

O rs62132295 do gene *PRTN3* estava em HWE no grupo de pacientes com VAA, com frequência alélica de 0,25, mas não estava em HWE no grupo controle, com frequência alélica de 0,21.

Ao compararmos todo o grupo de pacientes vs. grupo controle (**TABELA 3**), em relação ao rs62132295 não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Na sub-análise, quando comparamos pacientes e controles divididos de acordo com a etnia, verificamos que o rs62132295 foi mais frequente em pacientes pretos em homozigose (13,5% vs. 3,3%,  $P=0,0146$ ) do que em controles pretos.

**Tabela 1 - Dados descritivos (variáveis categóricas) do grupo de pacientes**

		n (%)
<b>Dados demográficos</b>		
Cor da pele	Branca	63 (54,7)
	Preta	52 (45,3)
Idade (década de vida)	18 a 29	8 (7,0)
	30 a 39	16 (13,9)
	40 a 49	22 (19,1)
	50 a 59	26 (22,6)
	60 a 69	28 (24,3)
	70 a 85	15 (13,0)
Sexo	Feminino	43 (37,4)
	Masculino	72 (62,6)
<b>Classificação da doença</b>		
Granulomatose com poliangeíte		75 (65,2)
Granulomatose eosinofílica com poliangeíte		20 (17,4)
Poliangeíte microscópica		20 (17,4)
<b>Características clínicas / órgãos acometidos</b>		
Sintomas sistêmicos		62 (53,9)
Sistema nervoso central		9 (7,8)
Nervo periférico		36 (31,3)
Manifestações oculares		24 (20,9)
Rinossinusite		82 (71,3)
Otite		23 (20,0)
Manifestação pulmonar		84 (73,0)
Nódulo pulmonar		41 (35,7)
Hemorragia alveolar		22 (19,1)
Doença intersticial pulmonar		4 (3,5)
Bronquiectasia		13 (11,3)
Glomerulonefrite		56 (48,7)
Artrite		22 (19,1)
Lesões cutâneas		37 (32,2)
Asma		20 (17,4)
<b>Itens do Vasculitis damage index (VDI)</b>		
Fraqueza ou atrofia muscular significativa		9 (7,8)
Artrite erosiva-deformante		0 (0,0)
Osteoporose-fratura vertebral		32 (27,8)
Necrose avascular		2 (1,7)
Osteomielite		1 (0,9)
Alopecia		0 (0,0)
Úlceras cutâneas		1 (0,9)
Úlceras orais		0 (0,0)
Catarata		6 (5,2)
Dano retina		1 (0,9)

**continua**

**continuação****Itens do Vasculitis damage index**

Atrofia óptica	3 (2,6)
Déficit visual / diplopia	8 (7,0)
Cegueira em um olho	5 (4,3)
Cegueira segundo olho	2 (1,7)
Destruição parede orbitária	6 (5,2)
Perda auditiva	20 (17,4)
Obstrução nasal	18 (15,7)
Colapso da ponte nasal	23 (20,0)
Sinusopatia crônica	58 (50,4)
Estenose subglótica	6 (5,2)
Hipertensão pulmonar	0 (0,0)
Fibrose pulmonar	4 (3,5)
Infarto pulmonar	0 (0,0)
Fibrose pleural	0 (0,0)
Asma crônica	15 (13,0)
Dispneia crônica	31 (27,0)
Função pulmonar reduzida	15 (13,0)
Angina	2 (1,7)
Infarto miocárdico	2 (1,7)
Segundo infarto miocárdico	0 (0,0)
Cardiomiopatia	7 (6,1)
Doença valvar	0 (0,0)
Pericardite	0 (0,0)
Pressão arterial diastólica > 95mmHg	59 (51,3)
Ausência de pulso em um membro	0 (0,0)
Doença vascular periférica	0 (0,0)
Claudicação	0 (0,0)
Perda tecidual periférica menor	1 (0,9)
Perda tecidual periférica maior	0 (0,0)
Segunda perda tecidual	0 (0,0)
Trombose venosa	2 (1,7)
Infarto Intestinal	1 (0,9)
Insuficiência mesentérica	2 (1,7)
Peritonite crônica	0 (0,0)
Estenose esofágica	2 (1,7)
Clearance de creatinina < 50ml/min	21 (18,3)
Proteinúria >500mg/24h	16 (13,9)
Doença renal terminal	15 (13,0)
Déficit cognitivo	0 (0,0)
Psicose	0 (0,0)
Epilepsia	0 (0,0)
Primeiro acidente vascular cerebral	4 (3,5)
Segundo acidente vascular cerebral	0 (0,0)
Lesão nervo craniano	4 (3,5)

**continua**

**continuação**

<b>Itens do Vasculitis damage index</b>		
Neuropatia periférica		29 (25,2)
Mielite transversa		0 (0,0)
Falência gonadal		2 (1,7)
Falência medular		1 (0,9)
Diabetes		15 (13,0)
Cistite química		2 (1,7)
Câncer		7 (6,1)
<b>Óbito e causa da morte</b>		
Óbito		11 (10,7)
	Doença ativa	4 (36,4)
	Infecção	5 (45,5)
Causa	Doença cardiovascular	1 (9,0)
	Câncer	0 (0,0)
	Desconhecido	1 (9,0)
<b>Características imunológicas</b>		
Antimieloperoxidase positivo (anti-PR3)	Positivo	20 (17,4)
Antiproteinase-3 positivo (anti-MPO)	Positivo	39 (33,9)
	Negativo	19 (16,5)
Padrão do ANCA na imunofluorescência indireta	c-ANCA	65 (56,5)
	p-ANCA	31 (27,0)
<b>Características genéticas</b>		
	CC	106 (92,2)
SERPINA1 SNP rs7151526 (A)	CA	7 (6,1)
	AA	2 (1,7)
	CC	106 (92,2)
SERPINA1 SNP rs28929474 (T)	CT	7 (6,1)
	TT	2 (1,7)
	CC	68 (59,1)
PRTN3 SNP rs62132295 (G)	GG	36 (31,3)
	GG	11 (9,6)
	GG	11 (9,6)

**SNP:** *Single nucleotide polymorphism* ou polimorfismo de um único nucleotídeo; **c-ANCA:** padrão citoplasmático; **p-ANCA:** padrão perinuclear.

A letra "C" representa o alelo sem o SNP; as letras "A", "T" e "G" representam os alelos com os SNPs.

**conclusão**



**Tabela 2- Dados descritivos (variáveis contínuas) do grupo de pacientes**

<b>Parâmetros</b>	<b>Mediana (25%-75%)</b>
<i>Vasculitis damage index</i>	4 (2-6)
<i>Birmingham vasculitis activity index - máximo (2 anos)*</i>	2 (0-7)
Idade (anos)	53 (43-63)
Tempo de seguimento (anos)**	5 (2-12)

\*Maior valor do *Birmingham vasculitis activity index* nos dois anos anteriores à inclusão no estudo.

\*\* Considerando o período desde o diagnóstico até inclusão no estudo mais o período em que o paciente ficou em seguimento no estudo.

Tabela 3 - Análise comparativa entre pacientes e controles: geral e por etnia

SNPs		SERPINA1 rs7151526 (A)			SERPINA1 rs28929474 (T)			PRTN3 rs62132295 (G)			
Genótipos		CC	CA	AA	CC	CT	TT	CC	CG	GG	
<b>Geral n(%)</b>											
<b>Geral</b>	<b>Controles</b>	608	559 (91,9)	48 (7,9)	1 (0,2)	600 (98,7)	8 (1,3)	0 (0,0)	391 (64,3)	180 (29,6)	37 (6,1)
	<b>Pacientes</b>	115	106 (92,2)	7 (6,1)	2 (1,7)	106 (92,2)	7 (6,1)	2 (1,7)	68 (59,1)	36 (31,3)	11 (9,6)
	<b>Valor de P</b>		<b><u>0,045</u></b>			<b><u>&lt;0,0001</u></b>			<b><u>0,22</u></b>		
<b>Etnia n(%)</b>											
<b>Branco</b>	<b>Controles</b>	398	357 (89,7)	40 (10)	1 (0,3)	391 (98,2)	7 (1,8)	0 (0,0)	255 (64,1)	113 (28,4)	30 (7,5)
	<b>Pacientes</b>	63	61 (96,8)	2 (3,2)	0 (0,0)	60 (95,2)	3 (4,8)	0 (0,0)	38 (60,3)	21 (33,3)	4 (6,3)
	<b>Sig.</b>		<b><u>0,195</u></b>			<b><u>0,128</u></b>			<b><u>0,711</u></b>		
<b>Preto</b>	<b>Controles</b>	210	202 (96,2)	8 (3,8)	0 (0,0)	209 (99,5)	1 (0,5)	0 (0,0)	136 (64,8)	67 (31,9)	7 (3,3)
	<b>Pacientes</b>	52	45 (86,5)	5 (9,6)	2(3,8)	46 (88,5)	4 (7,7)	2(3,8)	30 (57,7)	15 (28,8)	7 (13,5)
	<b>Valor de P</b>		<b><u>0,0035</u></b>			<b><u>&lt;0,0001</u></b>			<b><u>0,0146</u></b>		

**SNP:** *single nucleotide polymorphism* ou polimorfismo de um único nucleotídeo.

A letra "C" representa os alelos sem o SNP, enquanto as letras "A", "T" e "G" representam os alelos com a presença dos SNPs.

P significativo: < 0,05.

## 4.2. Pacientes não carreadores versus. pacientes carreadores dos polimorfismos de um único nucleotídeo ou *single nucleotide polymorphism*

### 4.2.1. Gene *SERPINA1*

Entre os pacientes com VAA (**TABELA 4**), a análise alélica demonstrou em relação ao rs28929474 que 72,7% dos carreadores deste SNP eram pretos ( $p=0,06$ ) e 81,9% tinham idade inferior a 50 anos ( $P=0,018$ ). Em relação ao rs7151526, 81,8% dos carreadores eram pretos ( $P=0,012$ ) e 81,9% tinham idade ao diagnóstico inferior a 50 anos ( $P=0,023$ ).

Na análise genotípica, hemorragia alveolar foi mais frequente em carreadores de ambos os SNPs do gene *SERPINA1* em heterozigose (para ambos 57,1% vs. 17%,  $P=0,026$ ). Considerando os itens do VDI, na análise genotípica estes SNPs em homozigose se associaram a maior frequência de déficit visual/diplopia (para ambos 50% vs. 6,6%,  $P=0,044$ ) e o rs7151526 em heterozigose a maior frequência de estenose subglótica (28,6% vs. 3,8%,  $P=0,016$ ). Na análise alélica o rs7151526 também se associou a estenose subglótica (18,2% vs. 4,6%,  $P=0,048$ ).

As concentrações séricas de A1AT foram significativamente menores e abaixo do valor de normalidade nos pacientes homozigotos para o rs28929474 do gene *SERPINA1*, em relação aos que não apresentavam este SNP: 24,5 (20,0 - 29,0) mg/dL vs. 143,0 (128,5 - 163,5) mg/dL,  $P=0,010$ . Pacientes heterozigotos para este mesmo SNP apresentaram níveis séricos inferiores em comparação àqueles sem este SNP, mas com mediana ainda dentro do valor de normalidade: 90,0 (68,0 - 130,0) mg/dL vs. 143,0 (128,5 - 163,5) mg/dL,  $P=0,007$ . Os achados em relação ao rs7151526 são semelhantes, dado o desequilíbrio de ligação entre estes SNPs (**TABELAS 5 e 6**).

### 4.2.2. Gene *PRTN3*

As análises genotípica e alélica do rs62132295 do gene *PRTN3* não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entres os grupos em relação a etnia, gênero, idade ou manifestações clínicas. Com relação aos itens do VDI, na análise genotípica carreadores deste SNP em homozigose apresentaram maior frequência de cegueira em um olho (18,2% vs. 4,6%,  $P=0,035$ ), e na análise alélica

maior frequência de falência gonadal (5,2% vs. 0,6%,  $P=0,021$ ) (dados não mostrados nas TABELAS).

#### **4.2.3. Análise de sobrevida**

Considerando o intervalo de tempo entre o diagnóstico e a inclusão no estudo, mais o intervalo de tempo do estudo, os pacientes foram acompanhados por um tempo médio de 5 anos (IQR 2-12 anos). Onze pacientes morreram durante o período do estudo (junho de 2018 a julho de 2021), sendo infecção a principal causa de morte (45%), seguida por atividade da doença (36%), doença cardiovascular (9%) e causa desconhecida (9%) (**TABELAS 1 E 2**).

Na **TABELA 7** é apresentada a análise univariada da comparação de dados demográficos, clínicos e imunológicos entre pacientes sobreviventes versus não sobreviventes. Diabetes mellitus ( $P=0,002$ ), doença renal terminal ( $P=0,03$ ), falência medular ( $P<0,001$ ), bronquiectasia ( $P=0,017$ ), acometimento ocular ( $P=0,011$ ), positividade do ANCA ( $P=0,026$ ) e maior média de idade ( $P=0,019$ ) se associaram com mortalidade.

A análise de sobrevida (**TABELA 8**) mostrou que a presença do rs28929474 do gene *SERPINA1* esteve associada a uma sobrevida média menor [54,9 (40,9 - 68,9) anos] em relação àqueles que não apresentavam este SNP [68,0 (67,2 - 69,0) anos,  $P<0,0001$ ]. Dados referentes ao rs7151526, que está em desequilíbrio de ligação com o alelo Z, demonstraram achados semelhantes: 57,4 (42,7 - 72,2) anos vs. 68,0 (67,2 - 68,9) anos em não portadores,  $P<0,0001$ .

No modelo de risco proporcional de Cox (**TABELA 9**) vemos que a associação entre ambos os SNPs do gene *SERPINA1* foi o fator mais fortemente associado à mortalidade (HR=6,2, IC95%=1,4-27,1,  $P=0,015$ ) em nossa coorte, seguido por bronquiectasias (HR=5,8, IC 95%=1,8-19,1,  $P=0,003$ ), diabetes mellitus (HR=5,3, IC95%=1,8-15,7,  $P=0,027$ ), doença renal terminal (HR=3,9, IC95%=1,2-12,7,  $P=0,028$ ) e acometimento ocular (HR=3,0, IC 95%=1,1-8,6,  $P=0,004$ ).

**Tabela 4 - Comparação genotípica e alélica entre pacientes carreadores versus não carreadores dos polimorfismos de um único nucleotídeo**

Genótipo / Alelo	SERPINA1 SNP rs7151526 (A)						SERPINA1 SNP rs28929474 (T)								
	CC	CA	AA	Valor de P	C	A	Valor de P	CC	CT	TT	Valor de P	C	T	Valor de P	
	n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		
<b>Cor*</b>															
Branca	61 (57,5)	2(28,6)	0 (0,0)	0,096	124 (56,6)	2 (18,2)	0,012	60 (56,6)	3 (42,9)	0 (0,0)	0,227	123 (56,2)	3 (27,3)	0,060	
Preta	45 (42,5)	5(71,4)	2 (100)		95 (43,4)	9 (81,8)		46 (43,4)	4 (57,1)	2 (100)		96 (43,8)	8 (72,7)		
<b>Idade ao diagnóstico (anos)</b>															
10 a 19	4 (3,8)	1(14,3)	1 (50,0)	0,125	9 (4,1)	3 (27,3)	0,023	4 (3,8)	1 (14,3)	1 (50,0)	0,096	9 (4,1)	3 (27,3)	0,018	
20 a 29	9 (8,5)	0(0,0)	1 (50,0)		18 (8,2)	2 (18,2)		9 (8,5)	0 (0,0)	1 (50,0)		18 (8,2)	2 (18,2)		
30 a 39	25 (23,6)	2(28,6)	0 (0,0)		52 (23,7)	2 (18,2)		26 (24,5)	1 (14,3)	0 (0,0)		53 (24,2)	1 (9,1)		
40 a 49	28 (26,4)	2(28,6)	0 (0,0)		58 (26,5)	2 (18,2)		27 (25,5)	3 (42,9)	0 (0,0)		57 (26,0)	3 (27,3)		
50 a 59	22 (20,8)	0(0,0)	0 (0,0)		44 (20,1)	0 (0,0)		22 (20,8)	0 (0,0)	0 (0,0)		44 (20,1)	0 (0,0)		
60 a 69	11 (10,4)	1(14,3)	0 (0,0)		23 (10,5)	1 (9,1)		11 (10,4)	1 (14,3)	0 (0,0)		23 (10,5)	1 (9,1)		
70 a 79	7 (6,6)	1(14,3)	0 (0,0)		15 (6,8)	1 (9,1)		7 (6,6)	1 (14,3)	0 (0,0)		15 (6,8)	1 (9,1)		
<b>Sexo</b>															
Mulheres	41 (38,7)	1 (14,4)	1 (50,0)	0,405	83 (37,9)	3 (27,3)	0,477	41 (38,7)	1 (14,3)	1 (50,0)	0,405	83 (37,9)	3 (27,3)	0,477	
Homens	65 (61,3)	6 (85,7)	1 (50,0)		136 (62,1)	8 (72,7)		65 (61,3)	6 (85,7)	1 (50,0)		136 (62,1)	8 (72,7)		
<b>Classificação</b>															
Granulomatose com poliangiíte	69 (65,1)	4 (57,1)	2 (100)	0,267	142 (64,8)	8 (72,7)	0,252	69 (65,1)	4 (57,1)	2 (100)	0,267	142 (64,8)	8 (72,7)	0,252	
Granulomatose eosinofílica com poliangiíte	20 (18,9)	0 (0,0)	0 (0,0)		40 (18,3)	0 (0,0)		20 (18,9)	0 (0,0)	0 (0,0)		40 (18,3)	0 (0,0)		
Poliangiíte microscópica	17 (16,0)	3 (42,9)	0 (0,0)		37 (16,9)	3 (27,3)		17 (16,0)	3 (42,9)	0 (0,0)		37 (16,9)	3 (27,3)		
<b>Manifestações clínicas*</b>															
Rinossinusite	76 (71,7)	4 (57,1)	2 (100)	0,473	156 (71,2)	8 (72,7)	0,915	76 (71,7)	4 (57,1)	2 (100)	0,473	156 (71,2)	8 (72,7)	0,915	
Nódulo pulmonar	37 (34,9)	3 (42,9)	1 (50,0)	0,834	77 (35,2)	5 (45,5)	0,487	37 (34,9)	3 (42,9)	1 (50,0)	0,834	77 (35,2)	5 (45,5)	0,487	
Hemorragia alveolar	18 (17,0)	4 (57,1)	0 (0,0)	0,026	40 (18,3)	4 (36,4)	0,136	18 (17,0)	4 (57,1)	0 (0,0)	0,026	40 (18,3)	4 (36,4)	0,136	
Glomerulonefrite	52 (49,1)	3 (42,9)	1 (50,0)	0,950	107 (48,9)	5 (45,5)	0,826	51 (48,1)	4 (57,1)	1 (50,0)	0,898	106 (48,4)	6 (54,5)	0,691	
<b>Dano VDI*</b>															
Déficit visual / diplopia	7 (6,6)	0 (0,0)	1 (50,0)	0,044	14 (6,4)	2 (18,2)	0,134	7 (6,6)	0 (0,0)	1 (50,0)	0,044	14 (6,4)	2 (18,2)	0,134	
Estenose subglótica	4 (3,8)	2 (28,6)	0 (0,0)	0,016	10 (4,6)	2 (18,2)	0,048	5 (4,7)	1 (14,3)	0 (0,0)	0,515	11(5,0)	1 (9,1)	0,554	
<b>ANCA*</b>															
MPO-ANCA+ (ELISA)	17 (16,0)	3 (42,9)	0 (0,0)	0,156	37 (16,9)	3 (27,3)	0,376	17 (16,0)	3 (42,9)	0 (0,0)	0,156	37 (16,9)	3 (27,3)	0,376	
PR3-ANCA+ (ELISA)	36 (34,0)	3 (42,9)	0 (0,0)	0,528	75 (34,2)	3 (27,3)	0,634	36 (34,0)	3 (42,9)	0 (0,0)	0,528	75 (34,2)	3 (27,3)	0,634	
ANCA negativo (IFI)	19 (17,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,239	38 (17,4)	0 (0,0)	0,302	19 (17,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,239	38 (17,4)	0 (0,0)	0,302	
c-ANCA (IFI)	60 (56,6)	3 (42,9)	2 (100)	0,239	123 (56,2)	7 (63,6)	0,302	60 (56,6)	3 (42,9)	2 (100)	0,239	123 (56,2)	7 (63,6)	0,302	
p-ANCA (IFI)	27 (25,5)	4 (57,1)	0 (0,0)	0,239	58 (26,5)	4 (36,4)	0,302	27 (25,5)	4 (57,1)	0 (0,0)	0,239	58 (26,5)	4 (36,4)	0,302	

**SNP:** Single nucleotide polymorphism ou polimorfismo de um único nucleotídeo; **VDI:** Vasculitis damage index; **ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay; **MPO:** mieloperoxidase; **PR3:** proteinase-3; **IFI:** imunofluorescência indireta; **c-ANCA:** padrão citoplasmático; **p-ANCA:** padrão perinuclear.

A letra "C" representa o alelo sem o SNP; as letras "A" e "T" representam os alelos com os SNPs.

\*Os valores numéricos n(%) apresentados se referem a quantos indivíduos de cada categoria genotípica ou alélica (CC/CA/AA ou C/A; CC/CT/TT ou C/T) apresentavam a manifestação clínica, dano ou presença do ANCA

P significativo: < 0,05.

Tabela 5 - Concentração sérica de alfa-1-antitripsina de acordo com genótipo - *SERPINA1* SNP rs28929474 (T)

Genótipo	Mediana (25%-75%)			Valor de <i>P</i>	Valor de <i>P</i>		
	CC	CT	TT		CC vs. CT	CC vs. TT	CT vs. TT
A1AT	143,0 (128,5-163,5)	90,0 (68,0-130,0)	24,5 (20,0-29,0)	0,002	0,007	0,010	0,056

**SNP:** *single nucleotide polymorphism*, ou polimorfismo de um único nucleotídeo; **A1AT:** alfa-1-antitripsina.

A letra "C" representa o alelo sem o SNP; a letra "T" representa o alelo com o SNP.

*P* significativo: < 0,05.

Tabela 6 - Concentração sérica de alfa-1-antitripsina de acordo com genótipo - *SERPINA1* SNP rs7151526 (A)

Genótipo	Mediana (25%-75%)			Valor de <i>P</i>	Valor de <i>P</i>		
	CC	CA	AA		CC vs. CA	CC vs. AA	CT vs. AA
A1AT	143,0 (127,5-163,5)	99,0 (86,0-153,0)	24,5 (20,0-29,0)	0,011	0,069	0,010	0,056

**SNP:** *single nucleotide polymorphism*, ou polimorfismo de um único nucleotídeo; **A1AT:** alfa-1-antitripsina.

A letra "C" representa o alelo sem o SNP; a letra "A" representa o alelo com o SNP.

*P* significativo: < 0,05.

**Tabela 7 - Análise univariada: pacientes sobreviventes versus. não sobreviventes**

<b>Óbito</b>	<b>Não (n, %)</b>	<b>Sim (n, %)</b>	<b>Valor de P</b>
Sexo masculino	122 (61,0)	18 (75,0)	0,181
Diabetes mellitus	22 (11,0)	8 (33,3)	0,002
Doença renal terminal *	20 (10,0)	6 (25,0)	0,030
Proteinúria >500mg/24h	26 (13,0)	6 (25,0)	0,112
Função pulmonar reduzida	24 (12,0)	6 (25,0)	0,077
Falência medular	0 (0,0)	2 (8,3)	0,000
Bronquiectasia	18 (9,0)	6 (25,0)	0,017
Seios da face	148 (74,0)	14 (58,3)	0,105
Acometimento ocular (qualquer acometimento)	38 (19,0)	10 (41,7)	0,011
<i>Vasculitis damage index (VDI) &lt; 4</i>	94 (47,0)	8 (33,3)	0,204
ANCA positivo	156 (81,3)	22 (100)	0,026
Nódulo escavado	34 (17,0)	8 (33,3)	0,053
Idade (anos)	52,0 (41,0-62,0)	61,5 (49,5-66,0)	0,019
BVAS máximo <sup>5</sup> (2 anos)	1,0 (0-6,0)	4,0 (0-10,5)	0,139

Dados expressos em frequência (%) ou mediana (25%-75%).

\* Clearance de creatinina <15 ml/min ou em hemodiálise.

**BVAS:** *Birmingham vasculitis activity score.*

P significativo: < 0,05.

**Tabela 8 - Análise comparativa de sobrevida entre pacientes carreadores versus não carreadores dos polimorfismos de um único nucleotídeo dos genes *SERPINA1* (rs7151526 e rs28929474) e *PRTN3* (rs62132295)**

Kaplan-Meier	Estimativa média	Erro padrão	95% IC		Log-Rank (Mantel-Cox)
<b>Alelo</b>	67,69	0,52	66,67	68,70	
<b><i>SERPINA1</i> (rs7151526)</b>					
<b>C</b>	68,05	0,45	67,17	68,93	<i>P</i> <0,0001
<b>A</b>	57,43	7,51	42,70	72,15	
<b><i>SERPINA1</i> (rs28929474)</b>					
<b>C</b>	68,12	0,45	67,25	69,00	<i>P</i> <0,0001
<b>T</b>	54,93	7,14	40,94	68,92	
<b><i>PRTN3</i> (rs62132295)</b>					
<b>C</b>	67,64	0,61	66,45	68,83	<i>P</i> =0,907
<b>G</b>	67,77	1,03	65,76	69,79	

**SNP:** *single nucleotide polymorphism* ou polimorfismo de um único nucleotídeo.

A letra "C" representa o alelo sem o SNP; as letras "A", "T" e "G" representam os alelos com os SNPs  
*P* significativo: < 0,05.



Tabela 9 - Modelo de risco proporcional de Cox: fator genético e comorbidades

	Valor de <i>P</i>	Hazard ratio	95% IC	
<b>Fator genético</b>				
<b>Associação* <i>SERPINA1</i> SNPs</b>	0,015	6,2	1,4	27,1
<b>Comorbidades</b>				
<b>Envolvimento ocular (qualquer acometimento)</b>	0,004	3,0	1,1	8,6
<b>Bronquiectasias</b>	0,003	5,8	1,8	19,1
<b>Diabetes</b>	0,027	5,3	1,8	15,7
<b>Doença renal terminal**</b>	0,028	3,9	1,2	12,7

**SNP:** *single nucleotide polymorphism* ou polimorfismo de um único nucleotídeo.

\* Foi realizada a análise da associação dos SNPs do gene *SERPINA1* devido ao desequilíbrio de ligação entre eles (coeficiente de associação 0,88,  $P < 0,001$ ).

\*\* *Clearance* de creatinina  $< 15$  mL/min ou em hemodiálise.

*P* significativo:  $< 0,05$ .



## 5. DISCUSSÃO

No nosso conhecimento este foi o primeiro estudo a avaliar a associação entre os SNPs dos genes *SERPINA1* e *PRTN3* e o diagnóstico de VAA em uma coorte multiétnica brasileira. Até então os estudos principais se limitaram a analisar populações constituídas por pacientes brancos (MERKEL et al., 2017; LYONS et al., 2012; BORGMANN et al., 2001; ELZOUKI et al., 1994; BASLUND et al., 1996; ESNAULT et al., 1993). Os resultados do presente estudo confirmam a associação dos SNPs do gene *SERPINA1* com o diagnóstico das VAA, bem como sua associação a maior mortalidade, na população brasileira. Além disso, também verificamos que pacientes pretos apresentavam uma maior frequência destes polimorfismos em relação aos controles pretos.

Nosso grupo controle não foi pareado em relação a idade com o grupo de pacientes, sendo constituído por pacientes com > 60 anos. Uma vez que a média de idade dos pacientes com VAA no Brasil > 40 anos (BELEM et al., 2020), um grupo controle constituído por indivíduos mais velhos saudáveis nos parece adequado pois teria maiores chances de excluir indivíduos que ainda irão desenvolver uma VAA e indivíduos homocigotos para o alelo Z.

Ambos SNPs do gene *SERPINA1* não se encontravam em HWE no grupo de pacientes. Isso ocorre provavelmente devido ao fato da presença deles se associar a uma maior mortalidade, o que demonstramos na análise de sobrevivência.

Nosso estudo também evidenciou que estes SNPs não têm segregação independente na população brasileira, visto que há uma associação entre eles de mais de 80%. LYONS et al. (2012) também demonstraram o desequilíbrio de ligação entre estes SNPs em uma população branca. O alelo Z é mais provavelmente a variante com importância na fisiopatologia das VAA, uma vez que a deficiência de A1AT seria um dos fatores responsáveis pela maior disponibilidade de PR3, facilitando seu processamento e apresentação via HLA de classe II (como o DP) aos linfócitos T *helper*, com conseqüente quebra da tolerância imunológica.

O SNP rs62132295 do gene *PRTN3* encontrava-se em HWE no grupo de pacientes, mas não no grupo controle. Não encontramos uma justificativa plausível para este resultado.

Na análise alélica verificamos uma maior frequência de pacientes pretos e com idade < 50 anos entre os portadores dos SNPs do gene *SERPINA1*. Nesta amostra os dois indivíduos que eram homozigotos para ambos os polimorfismos eram pretos e tinham idade < 30 anos. Este dado sugere considerarmos a investigação de deficiência de alfa-1-antitripsina em pacientes jovens com VAA, independente da etnia.

Com relação às manifestações clínicas, este estudo demonstra associação entre hemorragia alveolar e a presença de ambos SNPs do *SERPINA1*. Este resultado já havia sido demonstrado em dois estudos prévios (O'DONOGHUE et al., 1993; DESHAYES et al., 2019), e uma justificativa plausível seria uma maior disponibilidade da protease PR3 não antagonizada pela A1AT no pulmão, levando a fragilidade tecidual e facilitando o extravasamento vascular no contexto inflamatório das VAA. No nosso estudo a presença dos dois polimorfismos deste gene em homozigose se associou a déficit visual/diplopia. BASLUND et al. (1996) também verificou associação entre o alelo Z e sintomas oculares. A associação do rs7151526 com estenose subglótica, bem como a associação do rs62132295 do gene *PRTN3* com cegueira em um olho e falência gonadal, nos parece serem resultados inéditos que precisam ser replicados em outros estudos.

Em comparação aos não carreadores, pacientes heterozigotos para ambos os polimorfismos do gene *SERPINA1* apresentavam concentrações séricas significativamente inferiores de A1AT. Entretanto, a mediana destas concentrações ainda se encontrava dentro do limite da normalidade. Apenas os pacientes homozigotos para ambos os polimorfismos apresentavam concentrações séricas consistentemente baixas. Estes resultados são semelhantes aos demonstrados por DESHAYES et al. (2019) que comparou pacientes com VAA carreadores versus não carreadores do alelo Z. Reforçamos que o alelo Z é o responsável pela produção deficiente de A1AT, e os achados em relação ao rs7151526 se devem ao desequilíbrio de ligação entre estes dois SNPs.

Recentemente foi demonstrado que as concentrações séricas de A1AT estão aumentadas em pacientes com VAA em atividade, tanto em indivíduos anti-PR3 quanto anti-MPO positivos (EBERT et al, 2022). A A1AT é uma proteína de fase aguda, assim como a proteína C reativa, que aumenta em processos inflamatórios,

como é o caso das próprias VAA. Concluímos que apesar de não ser capaz de identificar adequadamente os pacientes heterozigotos, a dosagem de A1AT pode ser utilizada como método de rastreio da deficiência de A1AT em pacientes com VAA com objetivo de identificar possíveis homozigotos para o alelo Z, sobretudo em pacientes jovens.

Pacientes portadores de VAA apresentam um maior risco de morte em relação à população geral, com uma meta-análise recente demonstrando risco 2,7 vezes maior, com ênfase para mortes por infecção, sobretudo nos primeiros anos de doença quando o tratamento imunossupressor é mais agressivo, e doenças cardiovasculares (TAN et al., 2017; WALLACE et al., 2020). Na nossa coorte a principal causa de morte foi infecção, seguida por atividade de doença.

Idade avançada, acometimento cardíaco, renal e gastrointestinal graves, maiores escores de dano e atividade, biópsia renal com padrão esclerótico são exemplos de preditores de mortalidade descritos na literatura (GUILLEVIN et al., 2011; VEGA et al., 2016; BAI et al., 2018). Um estudo retrospectivo recente realizado pelo nosso grupo demonstrou que disfunção renal, maior pontuação no VDI e níveis elevados de proteína C reativa foram preditores de mortalidade na nossa população (DAGOSTIN et al., 2021).

A maior mortalidade entre pacientes com VAA carreadores do alelo Z já havia sido demonstrada em dois estudos retrospectivos realizados por ELZOUKI et al., 1994 e SEGELMARK et al., 1995. Nosso estudo avaliou prospectivamente os pacientes com VAA e identificou importante associação entre ambos os SNPs estudados do gene *SERPINA1* e menor expectativa de vida. Os dados são semelhantes em relação aos dois SNPs devido ao desequilíbrio de ligação entre eles. No modelo de risco proporcional de Cox a associação destes SNPs representou o principal fator relacionado à mortalidade em nossa coorte.

Em nossa coorte diabetes mellitus e doença renal terminal, reconhecidos fatores de risco para mortalidade na população geral (PROVENZANO et al., 2019; FEDELI et al., 2022), também foram associados a maior mortalidade em pacientes portadores de VAA. Além deles, bronquiectasias e acometimento ocular também se associaram a maior mortalidade. Aumento do risco de morte em pacientes com bronquiectasias e comorbidades (doença pulmonar obstrutiva, câncer de pulmão, doença

cardiovascular), foi demonstrado por CHOI et al. 2021. Uma hipótese que pode justificar tal achado em nossa população é que a presença de bronquiectasias aumentaria o risco de complicações infecciosas pulmonares em pacientes altamente imunossuprimidos. A associação do alelo Z a déficit visual/diplopia provavelmente explica a relação entre acometimento ocular e mortalidade.

Não foi possível estabelecer associação entre a presença dos SNPs estudados e a classificação das VAA (GPA *versus*. PAM *versus*. GEPA), nem com a especificidade do ANCA. Em nosso serviço, por muitos anos, tínhamos disponíveis apenas a dosagem dos ANCA por imunofluorescência indireta, e apenas mais recentemente foi introduzida a dosagem pelo método ELISA. É possível que muitos pacientes apresentem dosagens negativas pelo método ELISA por já estarem em tratamento imunossupressor.

Como uma importante limitação do nosso estudo destacamos a dificuldade em se estabelecer a etnia em um país tão miscigenado como o Brasil. É provável que muitos pacientes classificados como brancos tenham descendentes pretos, ou mesmo de outras etnias. Além disso, para simplificar a análise utilizamos apenas a classificação em brancos e pretos, e provavelmente muitos pacientes englobados em ambas as categorias poderiam ser classificados como pardos.



## 6. CONCLUSÕES

Nosso estudo é o primeiro a demonstrar a associação entre os SNPs rs7151526 e rs28929474 (alelo Z) do gene *SERPINA1* e o diagnóstico das VAA em uma coorte multiétnica brasileira, mesmo quando consideramos apenas pacientes e controles pretos. A presença destes SNPs foi mais frequente em pacientes jovens (< 50 anos), o que reforça a necessidade de realizar o rastreio de DA1AT neste grupo. Além disso, estes polimorfismos representaram um importante preditor de mau prognóstico nos pacientes com VAA, se associando a hemorragia alveolar e uma menor sobrevida.

O rs62132295 do gene *PRTN3* foi mais frequente em pacientes pretos em homozigose em comparação com controles pretos e possivelmente está associado à cegueira e falência gonadal.





## 7. REFERÊNCIAS

Alberici F, Martorana D, Bonatti F, Gioffredi A, Lyons PA, Vaglio A. Genetics of ANCA-associated vasculitides: HLA and beyond. *Clin Exp Rheumatol*. 2014; 32 (Suppl 82): S90-S97.

Bai YH, Li ZY, Chang DY, Chen M, Kallenberg CG, Zhao MH. The BVAS is an independent predictor of cardiovascular events and cardiovascular disease-related mortality in patients with ANCA-associated vasculitis: A study of 504 cases in a single Chinese center. *Semin Arthritis Rheum*. 2018; 47(4): 524-529.

Baslund B, Szpirt W, Eriksson S, Elzouki AN, Wiik A, Wieslander J, et al. Complexes between proteinase 3, alpha 1-antitrypsin and proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies: a comparison between alpha 1-antitrypsin PiZ allele carriers and non-carriers with Wegener's granulomatosis. *Eur J Clin Invest*. 1996; 26(9): 786-792.

Belem JMFM, Pereira RMR, Perez MO, do Prado LL, Calich AL, Sachetto Z, et al. Epidemiologic features of systemic vasculitides in the Southeast region of Brazil: Hospital-based survey. *J Clin Rheumatol*. 2020; 26 (7S Suppl 2): S106-S110.

Borgmann S, Endisch G, Urban S, Sitter T, Fricke H. A linkage disequilibrium between genes at the serine protease inhibitor gene cluster on chromosome 14q32.1 is associated with Wegener's granulomatosis. *Clin Immunol*. 2001; 98(2): 244-248.

Bottero P, Motta F, Bonini M, Vecchio F, Ierna F, Cuppari I, et al. Can HLA-DRB4 Help to Identify Asthmatic Patients at Risk of Churg-Strauss Syndrome? *ISRN Rheumatol*. 2014; 6; 843804.

Choi H, Yang B, Kim YJ, Sin S, Jo YS, Kim Y, et al. Increased mortality in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis with respiratory comorbidities. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 7126.

Comarmond C, Pagnoux C, Khellaf M, Cordier JF, Hamidou M, Viallard JF, et al. French Vasculitis Study Group. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss): clinical characteristics and long-term follow up of the 383 patients enrolled in the French Vasculitis Study Group cohort. *Arthritis Rheum*. 2013; 65(1): 270-281.

Cornec D, Cornec-Le Gall E, Fervenza FC, Specks U. ANCA-associated vasculitis - clinical utility of using ANCA specificity to classify patients. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12(10): 570-579.

Dagostin MA, Nunes SLO, Shinjo SK, Pereira RMR. Mortality predictors in ANCA-associated vasculitis: Experience of a Brazilian monocentric cohort of a rheumatology center. *Medicine (Baltimore)*. 2021; 100(51): e28305.

Deshayes S, Martin Silva N, Grandhomme F, Khoy K, Mariotte D, Boutemy J, et al. Clinical Effect of alpha-1 antitrypsin deficiency in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: Results from a French retrospective monocentric cohort. *J Rheumatol*. 2019; 46(11): 502-1508.

Ebert M, Jerke U, Eulenberg-Gustavus C, Kling L, Jenne D, Kirchner M, et al. Protective  $\alpha$ 1-antitrypsin effects in autoimmune vasculitis are compromised by methionine oxidation. *J Clin Invest*. 2022; 132(23): e160089.

Elzouki AN, Segelmark M, Wieslander J, Eriksson S. Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. *J Intern Med*. 1994; 236(5): 543-548.

Esnault VL, Testa A, Audrain M, Rogé C, Hamidou M, Barrier JH, et al. Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int*. 1993; 43(6): 1329-1332.

Exley AR, Bacon PA, Luqmani RA, Kitis GD, Gordon C, Savage CO, et al. Development and initial validation of the Vasculitis Damage Index for the standardized clinical assessment of damage in the systemic vasculitides. *Arthritis Rheum*. 1997; 40(2): 371-380.

Fedeli U, Schievano E, Masotto S, Bonora E, Zoppini G. Time series of diabetes attributable mortality from 2008 to 2017. *J Endocrinol Invest*. 2022; 45(2): 275-278.

Fuchs SC, Guimarães SM, Sortica C, Wainberg F, Dias KO, Ughini M, et al. Reliability of race assessment based on the race of the ascendants: a cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2002; 2: 1.

Gómez-Puerta JA, Gedmintas L, Costenbader KH. The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev.* 2013; 12(12): 1129-1135.

Guillevin L, Pagnoux C, Seror R, Mahr A, Mouthon L, Toumelin PL; French Vasculitis Study Group (FVSG). The Five-Factor Score revisited: assessment of prognoses of systemic necrotizing vasculitides based on the French Vasculitis Study Group (FVSG) cohort. *Medicine (Baltimore).* 2011; 90(1): 19-27.

Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(1): 1-11.

Lamprecht P, Kerstein A, Klapa S, Schinke S, Karsten CM, Yu X, et al. Pathogenetic and clinical aspects of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitides. *Front Immunol.* 2018; 9: 680.

Lopes JB, Danilevicius CF, Takayama L, Caparbo VF, Menezes PR, Scazufca M, et al. Prevalence and risk factors of radiographic vertebral fracture in Brazilian community-dwelling elderly. *Osteoporos Int.* 2011; 22(2): 711-719.

Lyons PA, Peters JE, Alberici F, Liley J, Coulson RMR, Astle W, et al. Genome-wide association study of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis reveals genomic loci stratified by ANCA status. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 5120.

Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S, Holle JU, Watts RA, Jayne DR, et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med.* 2012; 367(3): 214-223.

Merkel PA, Xie G, Monach PA, Ji X, Ciavatta DJ, Byun J, et al. Identification of functional and expression polymorphisms associated with risk for antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheumatol.* 2017; 69(5): 1054-1066.

Mukhtyar C, Lee R, Brown D, Carruthers D, Dasgupta B, Dubey S, et al. Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3). *Ann Rheum Dis.* 2009; 68(12): 1827-1832.

- Nakazawa D, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019; 15(2): 91-101.
- O'Donoghue DJ, Guickian M, Blundell G, Winney RJ. Alpha-1-proteinase inhibitor and pulmonary haemorrhage in systemic vasculitis. *Adv Exp Med Biol*. 1993; 336: 331-335.
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18(2): 134-147.
- Provenzano M, Coppolino G, Faga T, Garofalo C, Serra R, Andreucci M. Epidemiology of cardiovascular risk in chronic kidney disease patients: the real silent killer. *Rev Cardiovasc Med*. 2019; 20(4): 209-220.
- Rahmattulla C, Mooyart AL, van Hooven D, Schoones JW, Bruijn JA, Dekkers OM et al. Genetic variants in ANCA-associated vasculitis: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75(9): 1687-1692.
- Robson JC, Grayson PC, Ponte C, Suppiah R, Craven A, Judge A, et al. 2022 American College of Rheumatology/European Alliance of Associations for Rheumatology Classification Criteria for granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Rheumatol*. 2022; 74(3): 393-399.
- Russo R, Zillmer LR, Nascimento OA, Manzano B, Ivanaga IT, Fritscher L, et al. Prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency and allele frequency in patients with COPD in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2016; 42(5): 311-316.
- Salama AD. Genetics and pathogenesis of small-vessel vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018; 32(1): 21-30.
- Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S. The PiZ gene of alpha 1-antitrypsin as a determinant of outcome in PR3-ANCA-positive vasculitis. *Kidney Int*. 1995;48(3):844-50.
- Sinico RA, Radice A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) testing: detection methods and clinical application. *Clin Exp Rheumatol*. 2014; 32 (3 Suppl 82): S112-S117.

Strnad P, McElvaney NG, Lomas DA. Alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin Deficiency. *N Engl J Med*. 2020; 382(15): 1443-1455.

Suppiah R, Robson JC, Grayson PC, Ponte C, Craven A, Khalid S, et al. 2022 American College of Rheumatology/European Alliance of Associations for Rheumatology classification criteria for microscopic polyangiitis. *Ann Rheum Dis*. 2022; 81(3): 321-326.

Tan JA, Dehghan N, Chen W, Xie H, Esdaile JM, Avina-Zubieta JA. Mortality in ANCA-associated vasculitis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76(9): 1566-1574.

Trivioli G, Marquez A, Martorana D, Tesi M, Kronbichler A, Lyons PA, et al. Genetics of ANCA-associated vasculitis: role in pathogenesis, classification and management. *Nat Rev Rheumatol*. 2022; 18(10): 559-574.

Trivioli G, Terrier B, Vaglio A. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: understanding the disease and its management. *Rheumatology (Oxford)*. 2020; 1; 59 (Suppl 3): iii84-iii94.

Tsuchiya N. Genetics of ANCA-associated vasculitis in Japan: a role for HLA-DRB1\*09:01 haplotype. *Clin Exp Nephrol*. 2013; 17(5): 628-630.

Vaglio A, Martorana D, Maggiore U, Grasselli C, Zanetti A, Pesci A, et al. HLA-DRB4 as a genetic risk factor for Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(9): 3159-3166.

Vega LE, Espinoza LR. Predictors of poor outcome in ANCA-associated vasculitis (AAV). *Curr Rheumatol Rep*. 2016; 18(12): 70.

Wallace ZS, Fu X, Harkness T, Stone JH, Zhang Y, Choi H. All-cause and cause-specific mortality in ANCA-associated vasculitis: overall and according to ANCA type. *Rheumatology (Oxford)*. 2020; 59(9): 2308-2315.

Watts R, Lane S, Hanslik T, Hauser T, Hellmich B, Koldingsnes W, et al. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-

associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(2): 222-227.

Watts RA, Hatemi G, Burns JC, Mohammad AJ. Global epidemiology of vasculitis. *Nat Rev Rheumatol.* 2022; 18(1): 22-34.

Watts RA, Mahr A, Mohammad AJ, Gatenby P, Basu N, Flores-Suárez LF. Classification, epidemiology and clinical subgrouping of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 2015; 30 (Suppl 1): i14-i22.

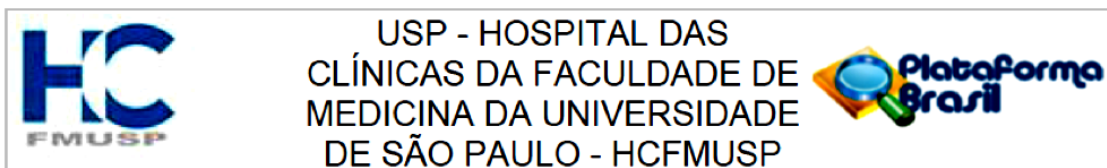
Wieczorek S, Hellmich B, Gross WL, Eppelen JT. Associations of Churg-Strauss syndrome with the HLA-DRB1 locus, and relationship to the genetics of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides: comment on the article by Vaglio et al. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(1): 329-330.

Xie G, Roshandel D, Sherva R, Monach PA, Lu EY, Kung T, et al. Association of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) with HLA-DPB1\*04 and SEMA6A gene variants: evidence from genome-wide analysis. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(9): 2457-2468.





## 8. ANEXO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de polimorfismos dos genes SERPINA1, PRTN3 e PTPN22 em uma população brasileira miscigenada de pacientes com vasculites associadas ao anticorpo anticitoplasma de neutrófilos (ANCA)

**Pesquisador:** Rosa Maria Rodrigues Pereira

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 18393119.7.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.729.686

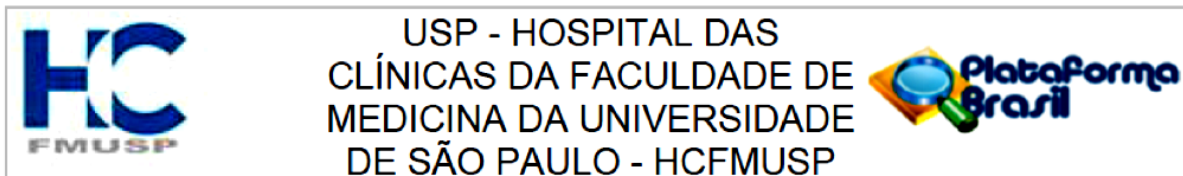
#### Apresentação do Projeto:

As vasculites ANCA associadas são doenças raras, de etiologia desconhecida. Polimorfismos dos genes SERPINA1, PRTN3 e PTPN22 tem sido associados como fatores de risco para o desenvolvimento destas doenças em estudos de exomas de populações caucasianas. Os principais estudos genéticos em VAA foram conduzidos em populações de origem caucasiana, na Europa e América do Norte. Ainda não existem estudos avaliando a presença de polimorfismos dos genes SERPINA1, PRTN3 e PTPN22 na população brasileira de pacientes com VAA.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, pela primeira vez, a associação entre polimorfismos dos genes SERPINA1, PRTN3 e PTPN22 numa população miscigenada brasileira de pacientes com Vasculites ANCA associadas, usando como controles amostras de DNA extraídos de 300 indivíduos com idade acima de 65 anos da coorte São Paulo Ageing and Health Study. **Objetivo Primário:** O objetivo primário do estudo será avaliar numa população brasileira miscigenada a presença dos principais polimorfismos dos genes SERPINA1, PRTN3 e PTPN22 relacionados a risco aumentado para desenvolvimento VAA de acordo com estudos de exoma da literatura e sua relação com o risco de ter o diagnóstico de uma VAA na

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.729.686

nossa população. Objetivo Secundário: Avaliar a presença dos anticorpos anti-LF na nossa população de pacientes com VAA e sua correlação com parâmetros laboratoriais de inflamação (proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação), presença dos anticorpos anti-PR3 e MPO e níveis de atividade de doença pelo escore BVAS.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos para os pacientes. Benefícios: Melhor entendimento dos fatores de risco genéticos para a doença pode beneficiar o estudo da fisiopatologia da doença, bem como auxiliar no desenvolvimento de novos critérios diagnósticos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está bem estruturado, com objetivos bem definidos, preservando os direitos dos indivíduos envolvidos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos apresentados estão adequados. 10336

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências ou inadequações. Todas as recomendações solicitadas anteriormente foram atendidas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1344133.pdf	11/11/2019 17:59:11		Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 3.729.686

Outros	CARTARESPOSTA_06_11_2019.pdf	11/11/2019 17:58:33	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_06_11_2019.pdf	11/11/2019 17:57:13	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	CARTARESPOSTA04_11_2019.pdf	04/11/2019 12:05:54	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	CARTAANUENCIA04_11_2019.pdf	04/11/2019 12:05:15	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE04_11_2019.pdf	04/11/2019 12:04:27	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	CARTEDECOMPROMISSOPG.pdf	02/08/2019 10:19:26	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	CARTAAPROVACAO.pdf	02/08/2019 10:18:28	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTOASSINADA.pdf	02/08/2019 09:47:00	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 27 de Novembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Joel Faintuch**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br