

MARÍLIA AMBIEL DAGOSTIN FURQUIM

**Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único de OPG e RANKL e
rinossinusite destrutiva em pacientes com granulomatose com poliangíte**

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

Co-orientador: Dr. Diogo Souza Domiciano

SÃO PAULO

2023

MARÍLIA AMBIEL DAGOSTIN FURQUIM

**Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único de OPG e RANKL e
rinossinusite destrutiva em pacientes com granulomatose com poliangíte**

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

Co-orientador: Dr. Diogo Souza Domiciano

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

Furquim, Marília Ambiel Dagostin
Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único de
OPG e RANKL e rinossinusite destrutiva em pacientes com
granulomatose com poliangiíte / Marília Ambiel Dagostin
Furquim.
-- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado) --Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético
Orientadores: Samuel Katsuyuki Shinjo
Coorientador: Diogo Souza Domiciano

Descritores: 1.Granulomatose com poliangiíte
2.Rinossinusite destrutiva 3.Anticorpo anti-citoplasma de
neutrófilos 4.Erosões ósseas faciais 5.Osteoprotegerina
6.Ligante RANK 7.Polimorfismo de nucleotídeo único

USP/FM/DBD- 342/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: Marília Ambiel Dagostin Furquim

Título: Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único de OPG e RANKL e rinossinusite destrutiva em pacientes com granulomatose com poliangiíte

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a 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: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por possibilitar todas as coisas.

À minha amada família, Vera, Denilson, Anelise e Raoni, por todo o suporte, o incentivo e o exemplo que me trouxeram até aqui.

De forma incondicional ao meu esposo Silas, pelo amor, pela presença constante, orientação e paciência, me fazendo acreditar que posso mais do que imagino.

À professora Rosa M. R. Pereira (*in memoriam*), por me ensinar a fazer pesquisa desde os passos mais básicos, sendo fonte de inspiração e grande exemplo de professora, pesquisadora e médica.

Aos meus orientadores, Dr. Samuel e Dr. Diogo, por terem aceitado o desafio da orientação de um trabalho já iniciado e completado esta missão com maestria.

Por fim e de forma especial, aos pacientes do ambulatório de Vasculites Sistêmicas da Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que, mesmo durante a difícil luta contra uma doença crônica e grave, aceitam contribuir para a pesquisa científica visualizando e depositando esperança nos futuros frutos de nosso trabalho.

SUMÁRIO

Pág.

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Primário	4
2.2. Secundário.....	4
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	5
3.1 Desenho do estudo e participantes.....	5
3.2 Coleta de dados e de amostra de sangue.....	6
3.3 Avaliação do dano ósseo	7
3.4 Avaliação da densidade mineral óssea	7
3.5 Genotipagem	7
3.6 Análise estatística	8
4. RESULTADOS.....	10
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	26
7. REFERÊNCIAS.....	27
8. ANEXOS	36

8.1 Parecer do Comitê de Ética	36
8.2 Submissão para publicação do presente estudo	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
ANCA	Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos
AR	Artrite reumatoide
BVAS	Birmingham Vasculitis Activity Score
CYC	Ciclofosfamida
DMO	Densidade mineral óssea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXA	Densitometria óssea
EULAR	Aliança Europeia de Associações para Reumatologia
GC	Glicocorticoide
GPA	Granulomatose com poliangiíte
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RANK	Receptor do ligante do fator nuclear kappa- β
RANKL	Ligante ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa- β
RTX	Rituximabe
SMZ-TMP	Sulfametoxazol-trimetoprima
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TC	Tomografia computadorizada

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Análise da frequência de erosões ósseas faciais em pacientes com nenhum, um ou dois dos SNPs associados às erosões ósseas (genótipo CC para o SNP OPG 1161 e genótipos AG ou GG para o SNP RANKL 290).....	16

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1. Dados clínicos e demográficos de pacientes com granulomatose com poliangiíte e indivíduos do grupo controle.....	11
2. Análise comparativa de pacientes com GPA classificados de acordo com a presença ou a ausência de erosões ósseas faciais vistas em tomografia computadorizada.....	12
3. Análise comparativa da frequência dos SNPs analisados em pacientes com granulomatose com poliangiíte e indivíduos do grupo controle.....	13
4. Análise comparativa da frequência dos SNPs analisados em paciente com granulomatose com poliangiíte com e sem erosões ósseas faciais.....	15
5. Comparação de características clínicas de pacientes com granulomatose com poliangiíte com o genótipo CC do gene OPG 1181 (rs2073618) e pacientes com os genótipos GC e GG.....	17
6. Comparação de características clínicas de pacientes com granulomatose com poliangiíte com os genótipos GG e GA do gene RANKL 245 (rs2277438) e pacientes sem o alelo G (genótipo AA).....	18
7. Regressão logística binária de variáveis possivelmente associadas com o desenvolvimento de erosões ósseas faciais em pacientes com GPA.....	19
8. Comparação de variáveis possivelmente associadas ao desenvolvimento de erosões ósseas faciais em pacientes com GPA em uma subanálise incluindo apenas pacientes com tempo de doença >3 anos.....	20

RESUMO

FURQUIM MAD. *Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único de OPG e RANKL e rinosinusite destrutiva em pacientes com granulomatose com poliangiíte* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução/objetivos. Rinosinusite crônica invasiva com dano ósseo facial é uma causa comum de comprometimento funcional e social em pacientes com granulomatose com poliangiíte (GPA). Até onde se sabe, não há biomarcador clínico ou laboratorial para prever o dano ósseo, nem abordagem terapêutica específica direcionada a esse aspecto da doença. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em RANKL e OPG podem afetar suas proteínas codificadas, e vários destes SNPs já foram implicados na suscetibilidade genética à osteoporose, fraturas osteoporóticas e erosões ósseas periarticulares na artrite reumatoide. A hipótese deste estudo é que SNPs em RANKL e OPG podem estar envolvidos na patogênese das alterações ósseas faciais na GPA, o que forneceria uma possível explicação genética para a predisposição de indivíduos selecionados a esse acometimento específico da doença. **Métodos.** Este estudo de caso-controle incluiu 90 pacientes com GPA e 270 controles saudáveis (grupo controle - GC). Os pacientes foram divididos de acordo com a presença de lesão óssea facial vista em tomografia computadorizada de face. A frequência dos SNPs de RANKL e OPG, analisados por reação em cadeia de polimerase em tempo real, foi comparada entre pacientes e GC e entre pacientes com e sem dano ósseo facial. Dados clínicos, terapêuticos e laboratoriais foram analisados. **Resultados.** Erosão óssea foi observada em 55,5% dos pacientes. Nenhuma diferença foi encontrada na frequência de SNPs entre pacientes com GPA e GC. Comparando os pacientes com GPA de acordo com a presença ou ausência de dano ósseo facial, foi encontrada diferença nas frequências de OPG G1181C (rs2073618) e RANKL A290G (rs2277438). A análise multivariada demonstrou que o genótipo CC de OPG 1181 foi independentemente associado à erosão óssea (OR=3,95, IC 95%=1,2-13, P=0,02), assim como a presença do alelo G em RANKL

A290G (OR=6,13, IC 95%=1,95-19,26, P=0,002) e maior duração da doença (OR=1,08, IC 95%=1,01-1,15, P=0,04). Em uma subanálise incluindo apenas pacientes com duração da doença > 3 anos, esses dois SNPs permaneceram independentemente associados à erosão óssea facial. **Conclusão.** SNPs em OPG G1181C e RANKL A290G podem estar envolvidos no desenvolvimento de rinosinusite destrutiva em pacientes com GPA. A avaliação genética pode ser uma ferramenta útil na identificação de indivíduos de alto risco para dano ósseo. Este estudo observacional serve como base para o desenvolvimento de estudos maiores visando melhor compreensão desta associação, e de ensaios clínicos utilizando-se RANKL e OPG como alvos terapêuticos.

Descritores: 1. Granulomatose com poliangiíte; 2. Rinosinusite destrutiva; 3. Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos; 4. Erosões ósseas faciais; 5. Osteoprotegerina; 6. RANK-ligante; 7. Polimorfismos de nucleotídeo único.

ABSTRACT

FURQUIM MAD. *Association between osteoprotegerin and RANKL single nucleotide polymorphisms and destructive rhinosinusitis in patients with granulomatosis with polyangiitis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Background. Chronic invasive rhinosinusitis with bone damage is a common cause of functional and social impairment in patients with granulomatosis with polyangiitis (GPA). To the best of our knowledge, there is no clinical or laboratory biomarker to predict bone damage, neither any specific therapeutic approach targeting this aspect of the disease. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in RANKL and OPG can affect their encoded proteins, and several SNPs have been implicated in genetic susceptibility to osteoporosis, osteoporotic fractures and articular bone erosions in rheumatoid arthritis. The hypothesis of this study is that RANKL and OPG SNPs may have a role in the pathogenesis of facial bone changes in GPA, which provides a possible genetic explanation for the predisposition of selected individuals to this specific involvement of the disease. **Methods.** This case-control study included 90 patients with GPA and 270 health controls (HCs). Patients were divided according to the presence of tomographic facial bone damage. The frequency of RANKL and OPG SNPs, analyzed by real-time polymerase chain reaction, were compared between patients and HCs and between patients with and without facial bone damage. Clinical, therapeutic, and laboratory data were analyzed. **Results.** Bone erosion was observed in 55.5% of patients. No difference was found in the frequency of SNPs between patients with GPA and HCs. Comparing patients with GPA according to the presence or absence of bone damage, a difference was found in the frequencies of osteoprotegerin G1181C (rs2073618) and RANKL A290G (rs2277438). A multivariate analysis showed that the CC genotype of osteoprotegerin 1181 was independently associated with bone erosion (OR=3.95, CI95%=1.20-13.00, P=0.02), as were the presence of the G allele in RANKL A290G (OR=6.13, CI95%=1.95-

19.26, P=0.002) and longer disease duration (OR=1.08, CI95%=1.01-1.15, P=0.04). In a sub-analysis including only patients with disease duration >3 years, these two SNPs remained independently associated with bone erosion. **Conclusion.** SNPs in osteoprotegerin G1181C and RANKL A290G may play a role in the development of destructive rhinosinusitis in patients with GPA. Genetic assessment may be useful for identifying high-risk individuals. This observational study can serve as a basis for further research to better understand this association and clinical trials using RANKL/osteoprotegerin as therapeutic targets.

Keywords: 1. Granulomatosis with polyangiitis; 2. Destructive rhinosinusitis; 3. Antineutrophil cytoplasmic antibody; 4. Facial bone erosions; 5. Osteoprotegerin; 6. RANK-ligand; 7. Single nucleotide polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

A granulomatose com poliangiíte (GPA) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada por vasculite necrotizante e inflamação granulomatosa em vasos de pequeno e médio calibre¹. Trata-se de condição mais frequente em indivíduos de raça branca, com idade média de início de 45 anos, e com um discreto predomínio do sexo masculino². A GPA está associada a presença de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) em 80 a 90% dos casos, em sua maioria com especificidade para proteinase-3³. O envolvimento do trato respiratório superior e inferior e a glomerulonefrite necrosante pauci-imune são acometimentos característicos da GPA, vistos em 85% e 70% dos casos, respectivamente^{4,5}.

Rinossinusite invasiva crônica com dano ósseo e cartilaginosa é comum na GPA, geralmente com início no septo nasal, se espalhando para os seios paranasais e a paredes orbitárias^{6,7}. Embora não aumente a mortalidade, esta característica da doença acarreta prejuízo funcional e social significativos⁸. Apesar disso, o conhecimento atual sobre as causas e mecanismos da destruição óssea na GPA é limitado. Necrose fibrinoide de pequenos vasos, granulomas epiteliais e necrose óssea avascular já foram aventados como partes importantes do processo⁹. Em uma grande coorte norueguesa de pacientes com GPA, doença mucosa no inicial, expressa pelo escore de Lund-McKay, foi o único dado associado à osteíte após 5 anos^{10,11}. Não há evidência, até o momento, de forma de manifestação, achados

laboratoriais, positividade de ANCA ou abordagem terapêutica que possa prever ou prevenir o dano ósseo.

Alterações ósseas em locais de inflamação tem sido ponto de interesse em outras doenças reumáticas, particularmente na artrite reumatoide (AR). A descoberta do RANK e de seu ligante levou à melhor compreensão do processo de remodelamento ósseo: o RANKL é secretado por osteoblastos e osteócitos e se liga ao RANK em osteoclastos, assim ativando-os para iniciar o processo de reabsorção óssea. Esta interação é inibida pela osteoprotegerina (OPG)^{12,13}. Um papel imunológico para a via RANK-RANKL também foi descrito na AR, no qual o RANKL é secretado por células T ativadas, estimulando osteoclastos no ambiente inflamatório sinovial e levando às erosões marginais características^{14,15}. Em um estudo com cultura de sinoviócitos reumatoides, Takayanagi *et al.* (2000) demonstraram que o RNA mensageiro de RANKL estava altamente expressado em todos os tecidos de pacientes com AR, mas não em pacientes com osteoartrite, uma doença menos inflamatória e menos erosiva que a AR¹⁶. Este trabalho também demonstrou que fibroblastos sinoviais reumatoides induzem osteoclastogênese de forma eficiente através da suprarregulação de RANKL e redução da expressão de OPG, e que a osteoclastogênese é inibida pela OPG de maneira dose-dependente.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês “*single nucleotide polymorphism*”), a forma mais comum de variação genética em humanos, são alterações na sequência genética de um único nucleotídeo¹⁷. SNPs em genes de RANK, RANKL e OPG podem afetar as proteínas codificadas por eles. Desde sua descoberta nos últimos 20 anos, vários SNPs têm sido implicados na

susceptibilidade genética a osteoporose e fraturas osteoporóticas¹⁸⁻²¹. Uma metanálise envolvendo três coortes francesas de pacientes com artrite reumatoide identificou um SNP localizado no RANK, um haplótipo no RANKL associado à presença de anticorpos contra peptídeos citrulinados, e um SNP localizado na OPG associado com erosões¹⁵.

Neste contexto, surge a hipótese de um papel para SNPs de RANKL e/ou OPG na patogênese de alterações ósseas faciais em pacientes com GPA, fornecendo uma possível explicação genética para a susceptibilidade de uma parcela dos indivíduos a este envolvimento característico da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Primário

Analisar a associação de polimorfismos de OPG e RANKL com erosões ósseas no trato respiratório superior de pacientes com GPA.

2.2. Secundário

Identificar características clínicas, laboratoriais e terapêuticas que poderiam estar relacionadas ao dano ósseo.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo e participantes

Foi realizado um estudo observacional retrospectivo de caso controle, no qual se investigou a associação entre um desfecho (erosões ósseas faciais) e um possível fator de risco genético. Foram convidados a participar do estudo os pacientes diagnosticados com GPA em acompanhamento regular no ambulatório de Vasculites das disciplinas de Reumatologia e Pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre julho de 2019 e julho de 2022. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (CAAE 50007521.1.0000.0068) e todos os participantes leram e assinaram um termo de consentimento informado.

GPA foi inicialmente definida de acordo com os critérios classificatórios do Colégio Americano de Reumatologia²² ou os critérios do Consenso Classificatório de Chapel Hill²³. Posteriormente, com a publicação dos novos critérios ACR/EULAR de GPA²⁴, estes foram aplicados de forma retrospectiva a todos os pacientes, e todos eles mantiveram a classificação de GPA. Pacientes com GPA de início na infância e na idade adulta foram incluídos, sem limitação quanto à idade de início da vasculite.

Pacientes cuja rinossinusite crônica ou o dano ósseo facial pudesse ser atribuído a uma causa alternativa, como linfoma, cirurgia, abuso de cocaína ou infecção fúngica, foram excluídos do estudo.

Um grupo controle pareado por sexo e etnia foi formado em uma proporção de 3 controles para cada paciente, composto por indivíduos sem qualquer doença autoimune que haviam participado em um estudo de coorte prévio do grupo²⁵⁻²⁷.

3.2 Coleta de dados e de amostra de sangue

A história médica pregressa do paciente, incluindo seus hábitos, tempo desde o diagnóstico, extensão da doença, positividade do Anticorpo Anti-citoplasma de neutrófilos e abordagens terapêuticas, foi coletada durante uma de suas visitas ambulatoriais regulares através de entrevista e revisão de prontuário médico.

A etnia foi definida com base na etnia autorreferida dos ancestrais de segunda geração, abordagem previamente utilizada para a população brasileira^{28,29}.

Foi considerada para a análise de abordagens terapêuticas prévias as doses cumulativas de ciclofosfamida e rituximabe desde o diagnóstico até a data da tomografia analisada, enquanto a dose cumulativa de glicocorticoide foi avaliada no período dos 12 meses antes da realização da tomografia considerada para a análise. A escolha deste período baseou-se no fato de que a dose cumulativa de glicocorticoide utilizada por cada paciente desde o diagnóstico é um dado pouco confiável para análise retrospectiva, com um grande percentual de informações faltantes, uma vez que os pacientes são referenciados ao serviço terciário já em uso de glicocorticoide por tempo variável, e que muitos pacientes fizeram uso de forma irregular sem supervisão médica antes de iniciar o seguimento.

Uma amostra de sangue periférico foi coletada de cada participante para extração do DNA e genotipagem.

3.3 Avaliação do dano ósseo

Os pacientes com GPA foram divididos em dois grupos de acordo com a presença de dano ósseo localizado em septo nasal, seios paranasais, parede orbitária e ossos temporais, avaliados por tomografia computadorizada (TC) sem contraste. As tomografias foram analisadas por dois radiologistas do serviço cegos para o resultado da genotipagem. Pacientes com mais de uma TC tiveram a mais recente considerada na análise. Para pacientes submetidos a cirurgia de face, o que poderia ser um fator confundidor para a presença de dano ósseo relacionado à vasculite, foi considerada a última TC realizada antes do procedimento.

3.4 Avaliação da densidade mineral óssea

Para avaliar uma possível relação entre a presença de erosões ósseas faciais e densidade mineral óssea (DMO) sistêmica, foram analisados dados de densidade mineral óssea de coluna lombar e fêmur de pacientes que já haviam sido submetidos a pelo menos uma densitometria óssea (DXA) durante o seguimento ambulatorial. Para os pacientes com mais de uma DXA disponível, foi considerada aquela mais próxima da tomografia óssea analisada no estudo.

3.5 Genotipagem

O DNA genômico foi isolado de leucócitos do sangue periférico com um kit de extração de DNA Qiagen (QIAamp DNA Blood Mini kit) e armazenado a -20°C antes da análise. Os SNPs analisados foram escolhidos com base em dados prévios de

literatura que sugeriram possíveis associações com massa óssea, risco de fratura, e erosões ósseas na AR³⁰⁻³³. Os SNPs selecionados foram: 1181 G>C (rs2073618), localizado no exon 1 de OPG; 245 T>G (rs3134069), 163 C>T (rs3102735) e 209 G>A (rs3134070), localizados na região promotora de OPG (localização cromossômica 8q24); e RANKL 290 A>G rs2277438, localizado na região não traduzida 5' de RANKL (13q14).

A genotipagem foi feita utilizando-se ensaios de genotipagem de SNP Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) com discriminação alélica, e reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos foram amplificados em uma reação 10- μ l, e as condições de ciclagem consistiram em um passo desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 15 segundos, e anelamento por 1 minuto a 60°C.

3.6 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar a normalidade da distribuição dos dados. As variáveis foram expressas como média e desvio padrão, mediana e interquartis, e frequência (%). Os pacientes e controles foram comparados com os testes t de Student, Mann-Whitney, qui-quadrado e teste exato de Fisher. Os pacientes foram então divididos de acordo com a presença ou ausência de dano ósseo tomográfico e comparados com os testes t de Student, Mann-Whitney, qui-quadrado e teste exato de Fisher. Modelos de regressão logística binária foram feitos para a análise de fatores independentemente associados com erosão óssea.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado em pacientes e controles comparando-se a distribuição observada dos SNPs com a distribuição esperada, com um teste exato do equilíbrio de Hardy Weinberg descrito em Wigginton *et al.*³⁴ e implementado no pacote SNPassoc. do R³⁵. Derivado de equações matemáticas para apoiar a teoria de herança Mendeliana, o teste de Hardy-Weinberg prova que em uma grande população de indivíduos submetidos à reprodução aleatória, a proporção de alelos e genótipos em um *locus* se mantém a mesma, a menos que influências modificadoras específicas sejam introduzidas. Este tem sido amplamente recomendado como um passo crucial em estudos de associação genética.

Os programas utilizados para a análise estatística foram: SPSS para Windows, versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) para avaliação de normalidade, cálculos de estatística geral não-genética e o R software³⁶ para a análise estatística dos SNPs. A significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

O estudo incluiu 90 pacientes com GPA e 270 controles pareados por sexo e etnia (**Tabela 1**). Os pacientes com GPA tinham uma idade média ao diagnóstico de 43,5 anos, e um tempo médio de doença de 7 anos no momento do estudo. O ANCA era positivo em 86% dos pacientes. 27% tinham a forma localizada da doença conforme a classificação descrita por Hellmich *et al.*, na qual não há envolvimento pela vasculite além do trato respiratório superior e inferior, e 50% tinham acometimento renal³⁷.

Erosão óssea facial foi observada em 50 dos 90 pacientes com GPA (55,5%), localizada principalmente nos seios paranasais (n=35), septo nasal (n=34) e parede orbitária (n=9).

Não foi evidenciada diferença em relação ao sexo, à etnia, a idade de início da GPA ou à história de tabagismo entre pacientes com e sem erosões ósseas (**Tabela 2**). Pacientes com dano ósseo facial tinham maior tempo desde o início da doença do que aqueles sem danos ósseos (9 versus 3 anos, P=0,04). A taxa de positividade do ANCA, a extensão da doença (localizada e sistêmica, a taxa de envolvimento renal e a abordagem terapêutica pregressa (uso e doses cumulativas de ciclofosfamida e rituximabe) foram similares entre os grupos.

TABELA 1. Dados clínicos e demográficos de pacientes com granulomatose com poliangiíte e indivíduos do grupo controle

	GPA (n=90)	Grupo controle (n=270)
Sexo feminino, n (%)	59 (65,5)	177 (65,5)
Raça branca, n (%)	70 (77,8)	210 (77,8)
Idade, anos	52 (43,7-62)	69 (68-70)
Idade ao diagnóstico, anos	43,5 (36-53)	-
Duração da doença, anos	7 (1,7-13,2)	-
ANCA (+), n (%)	78 (86,7)	-
GPA localizada, n (%)	25 (27,7)	
Erosão óssea facial, n (%)	50 (55,5)	
Envolvimento renal, n (%)	45 (50)	

Dados expressos em mediana (IQR) ou frequência (%).

ANCA: Anticorpo anticitoplasma de neutrófilos; GPA: granulomatose com poliangiíte.

TABELA 2. Análise comparativa de pacientes com GPA classificados de acordo com a presença ou a ausência de erosões ósseas faciais vistas em tomografia computadorizada.

	GPA com erosão (n=50)	GPA sem erosão (n=40)	P-valor
Sexo feminino, n (%)	31 (62)	28 (70)	0,43
Raça branca, n (%)	39 (78)	31 (77,5)	0,95
Tabagismo, n (%)	12 (0,24)	13 (0,32)	0,37
Idade ao diagnóstico, anos	43 (37,5-52,0)	45,5 (36,0-58,5)	0,52
Duração da doença, anos	9 (3,7-15)	3 (1-11,7)	0,04
ANCA(+), n (%)	43 (86)	35 (87,5)	1,0
GPA localizada, n (%)	14 (28)	11 (27,5)	0,96
Envolvimento renal, n (%)	25 (50)	20 (50)	1,0
Dose cumulativa de GC, mg	1675 (0-5884)	1498 (0-4288)	0,81
Uso de CYC, n (%)	33 (66,6)	27 (67,5)	0,88
Dose cumulativa de CYC, g	6,67 (0-15,6)	7,5 (0-34,8)	0,48
Uso de RTX, n (%)	19 (38)	11 (27,5)	0,29
Dose cumulativa de RTX, g	0 (0-5,1)	0 (0-2)	0,18
Uso de SMZ-TMP, n (%)	27 (54)	9 (22,5)	0,003

Dados expressos em mediana (IQR).

ANCA: Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos; GC: glicocorticoide; CYC: ciclofosfamida; GPA: granulomatose com poliangiíte; RTX: rituximabe; SMZ-TMP: sulfametoxazol-trimetoprima.

Nenhuma diferença foi encontrada na frequência dos 5 SNPs analisados entre os 90 pacientes com GPA e os 270 indivíduos do grupo controle (**Tabela 3**). Os pacientes com GPA não se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg em nenhum

dos genes estudados. Os pacientes do grupo controle não atingiram o equilíbrio de Hardy-Weinberg para o gene rs3134070 de OPG.

TABELA 3. Análise comparativa da frequência dos SNPs analisados em pacientes com granulomatose com poliangiíte e indivíduos do grupo controle

	GPA (n=90)	Controle (n=270)	OR CI95%	P- valor
OPG 209 C>T (rs3134070)				
- CC, n (%)	81 (90)	228 (84,4)	1,0	0,40
- CT, n (%)	8 (8,9)	37 (13,7)	0,61 (0,27-1,36)	
- TT, n (%)	1 (1,1)	5 (1,9)	0,56 (0,06-4,89)	
OPG 163 C>T (rs3102735)				
- TT, n (%)	67 (74,4)	191 (70,7)	1,0	0,77
- CT, n (%)	20 (22,2)	67 (24,8)	0,85 (0,48-1,51)	
- CC, n (%)	3 (3,3)	12 (4,4)	0,71 (0,20-2,60)	
OPG 1181 G>C (rs2073618)				
- GG, n (%)	20 (22,2)	45 (16,7)	1,0	0,23
- CG, n (%)	43 (47,8)	119 (44,1)	1,42 (0,43-1,53)	
- CC, n (%)	27 (30)	106 (39,3)	1,74 (0,29-1,13)	
OPG 245 A>C (rs3134069)				
- AA, n (%)	81 (90)	228 (84,4)	1,0	0,40
- AC, n (%)	8 (8,9)	38 (14,1)	0,59 (0,27-1,32)	
- CC, n (%)	1 (1,1)	4 (1,5)	0,70 (0,08-6,39)	
RANKL 290 A>G (rs2277438)				
- AA, n (%)	58 (64,4)	169 (62,6)	1,0	0,95
- AG, n (%)	27 (30,0)	85 (31,5)	0,93 (0,55-1,57)	
- GG, n (%)	5 (5,6)	16 (5,6)	0,91 (0,32-2,60)	

Dados expressos em frequência (%).

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; GPA: Granulomatose com Poliangiíte; OR: *Odds-ratio*; OPG: osteoprotegerina; RANKL: Ligante ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa- β .

Comparando-se pacientes com GPA divididos de acordo com a presença ou ausência de dano ósseo facial, uma diferença foi encontrada na frequência de dois SNPs: OPG 1181 G>C (rs2073618) e RANKL 290 A>G (rs2277438) (tabela 4). Para o gene OPG 1181, 40% dos pacientes com erosões faciais tinham o genótipo CC, visto em apenas 17,5% dos pacientes sem erosões (OR 4,29, IC95% 1,24-14,83, $P=0,04$). Em um modelo recessivo, que comparou o genótipo CC com os genótipos GG e CG agrupados, um aumento de 3,14 vezes no risco de erosões foi observado no grupo com o genótipo CC ($P=0,01$). Em relação ao gene RANKL 290 A>G, pacientes com erosão tiveram maior frequência do alelo G do que aqueles sem erosão (60% versus 17,5%, $P=0,0005$). A presença deste alelo, seja em homozigose (GG) ou em heterozigose (GA), se associou a um aumento de 4,71 vezes no risco de erosões ósseas faciais (IC95% 1,76-12,64, $P=0,001$). As frequências dos outros três SNPs testados (OPG 209 C>T, OPG 163 C>T, e OPG 245 A>C) foram similares entre pacientes com e sem erosões ósseas faciais.

TABELA 4. Análise comparativa da frequência dos SNPs analisados em paciente com granulomatose com poliangiíte com e sem erosões ósseas faciais

	SNP	Com Erosão (n=50)	Sem erosão (n=40)	OR (IC 95%)	P-valor
rs3134070	OPG 209 C>T				
	Codominante				
	- CC	43 (86,0)	38 (95)	1,0	0,36
	- CT	6 (12)	2 (5)	2,65 (0,50-13,93)	
	- TT	1 (2)	0 (0)		
	Alelo C	92	78		0,19
	Alelo T	8	2		
rs3102735	OPG 163 C>T				
	Codominante				
	- TT	39 (78)	28 (70)	1,0	0,54
	- CT	9 (18)	11 (27,5)	0,59 (0,21-1,61)	
	- CC	2 (4)	1 (2,5)	1,44 (0,12-16,62)	
	Alelo C	87	67		0,54
	Alelo T	13	13		
rs2073618	OPG 1161 G>C				
	Codominante				
	- CC	8 (16)	12 (30)	1,0	0,04
	- CG	22 (44)	21 (52,5)	1,57 (0,54-4,61)	
	- GG	20 (40)	7 (17,5)	4,29 (1,24-14,83)	
	Alelo C	38	45		0,01
	Alelo G	62	35		
	Dominante				
	- CC	8 (16)	12 (30)	1,0	
	- CG/GG	42 (84)	28 (70)	2,25 (0,82-6,20)	0,11
Recessivo					
- CC/CG	30 (60)	33 (82,5)	1,00	0,02	
	- GG	20 (40)	7 (17,5)	3,14 (1,16-8,48)	
rs3134069	OPG 245 A>C				
	Codominante				
	- AA	43 (86)	38 (95)	1,0	0,36
	- AC	6 (12)	2 (5)	2,65 (0,50-13,93)	
	- CC	1 (2)	0		
	Alelo A	92	78		0,19
	Alelo C	8	2		
	Dominante				
- AA	43 (86)	38 (95)	1,00	0,14	
	- AC-CC	7 (14)	2 (5)	3,09 (0,61-15,8)	

rs2277438	RANKL 290 A>G				
	Codominante				
	- AA	25 (50)	33 (82,5)	1,0	0,002
	- AG	20 (40)	7 (17,5)	3,77 (1,38-10,31)	
	- GG	5 (10)	0		
	Alelo A	70	73		0,0005
	Alelo G	30	7		
	Dominante				
	- AA	25 (50)	33 (82,5)	1,0	0,001
	- AG-GG	25 (50)	7 (17,5)	4,71 (1,76-12,64)	

Dados expressos em frequência (%).

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; OR: *Odds-ratio*; OPG: osteoprotegerina; RANKL: Ligante ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa- β .

A concomitância dos dois SNPs associados à maior frequência de erosões ósseas faciais (CC em OPG 1191-rs2073618 e AG ou GG em RANKL 290-rs2277438) foi observada em 11 pacientes com GPA, e todos eles tinham erosões ósseas. Em contraste, 42 dos 90 pacientes com GPA não tinham nenhum destes dois polimorfismos, e a frequência de erosões neste subgrupo foi de 38,1% (16 de 42) (**Figura 1**).

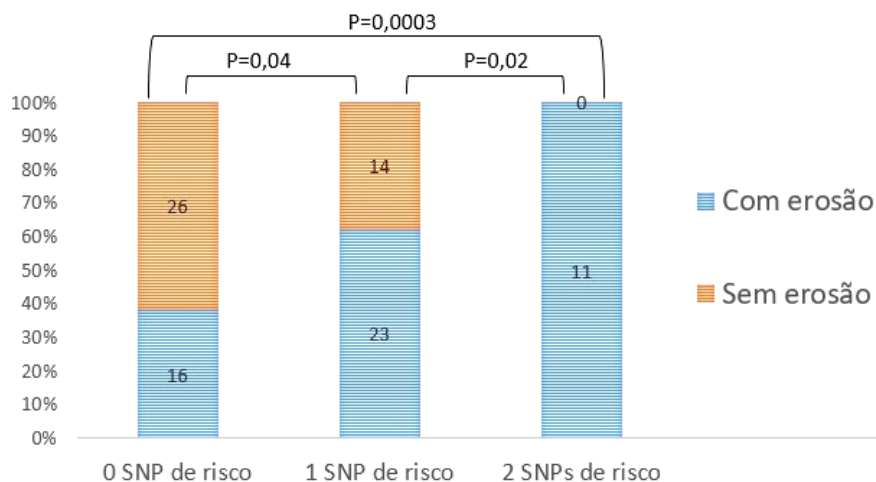


FIGURA 1. Análise da frequência de erosões ósseas faciais em pacientes com nenhum, um ou dois dos SNPs associados às erosões ósseas (genótipo CC para o SNP OPG 1161 e genótipos AG ou GG para o SNP RANKL 290).

Foram comparadas as características clínicas e demográficas de pacientes com GPA com o genótipo CC de OPG 1181 (rs2073618) com os pacientes com os genótipos GG e GC. Além da maior frequência de erosões ósseas faciais no grupo com o genótipo CC (74,1% versus 47,6%, $P=0,02$), uma proporção menor de indivíduos de raça branca foi observada neste grupo (63% versus 84,1%, $P=0,03$) (tabela 5). Foi feita a mesma análise para o gene RANKL 290 (rs2277438), comparando indivíduos portadores do alelo G (genótipos AG ou GG) com aqueles sem o alelo G (genótipo AA). A única diferença observada foi a maior frequência de erosões ósseas faciais no primeiro grupo (78,1% versus 43,1%, $P=0,001$) (tabela 6).

TABELA 5. Comparação de características clínicas de pacientes com granulomatose com poliangiíte com o genótipo CC do gene OPG 1181 (rs2073618) e pacientes com os genótipos GC e GG

	CC (n=27)	GG/GC (n=63)	P-valor
Sexo feminino, n (%)	18 (66,7)	41 (65,1)	0,88
Raça branca, n (%)	17 (63)	53 (84,1)	0,03
Idade ao diagnóstico, anos	46,6 (\pm 14,7)	43,2 (\pm 15,6)	0,34
Duração da doença, anos	9 (2-15)	7 (1-13)	0,40
ANCA (+), n (%)	24 (88,9)	54 (85,7)	1,00
Erosões ósseas faciais, n (%)	20 (74,1)	30 (47,6)	0,02
GPA localizada, n (%)	6 (22,2)	19 (30,2)	0,44
Envolvimento renal, n (%)	16 (59,6)	29 (46)	0,25

Dados expressos em média (\pm desvio padrão), mediana (IQR) ou frequência (%). ANCA: Anticorpo Anti-citoplasma de Neutrófilos.

TABELA 6. Comparação de características clínicas de pacientes com granulomatose com poliangiíte com os genótipos GG e GA do gene RANKL 245 (rs2277438) e pacientes sem o alelo G (genótipo AA)

	GG/GA (n=32)	AA (n=58)	P value
Sexo feminino, n (%)	23 (71,9)	36 (62,1)	0,88
Raça branca, n (%)	27 (84,4)	43 (74,1)	0,30
Idade ao diagnóstico, anos	45,9 ± 15,5	43,3 ± 15,3	0,43
Duração da doença, anos	8,3 ± 7	8,2 ± 7,6	0,92
ANCA (+), n (%)	27 (84,4)	51 (87,9)	0,75
Erosões ósseas faciais, n (%)	25 (78,1)	25 (43,1)	0,001
GPA localizada, n (%)	10 (31,2)	15 (25,6)	0,58
Envolvimento renal, n (%)	14 (43,7)	31 (53,4)	0,38

Dados expressos em média (\pm desvio padrão), mediana (IQR) ou frequência (%).

ANCA: Anticorpo Anti-citoplasma de Neutrófilos.

Por fim, uma regressão logística binária foi realizada em um modelo que incluiu o resultado do teste genético na análise univariada, ajustado para variáveis consideradas clinicamente importantes para o desenvolvimento de erosões ósseas: duração da GPA, dose cumulativa de ciclofosfamida e de rituximabe (**Tabela 7**). Nesta análise, o genótipo CC do gene OPG 1181 foi independentemente associado com erosões ósseas faciais (OR 3,95, IC95% 1,2-13, $P=0,02$), bem como a presença do alelo G no gene RANKL 290 (OR 6,13, IC95% 1,95-19,26, $P=0,002$) e a duração da doença (OR 1,08, IC95% 1,005-1,15, $P=0,04$).

TABELA 7. Regressão logística binária de variáveis possivelmente associadas com o desenvolvimento de erosões ósseas faciais em pacientes com GPA

	Com erosão (n=50)	Sem erosão (n=40)	OR (IC 95%)	P- valor
Sexo feminino, n (%)	31 (62)	28 (70)	0,397 (0,14-1,16)	0,09
Duração da doença, anos	9 (3,7-15)	3 (1-11,7)	1,08 (1,005-1,15)	0,04
Dose cumulativa de CYC, g	6,67 (0-15,6)	7,5 (0-34,8)	0,99 (0,98-1,0)	0,13
Dose cumulativa de RTX, g	0 (0-5,1)	0 (0-2)	1,09 (0,94-1,26)	0,26
CC em OPG 1181 (rs2073618), n (%)	20 (40)	7 (17,5)	3,95 (1,2-13)	0,02
GA/GG em RANKL 290 (rs2277438), n(%)	30 (60)	7 (17,5)	6,13 (1,95-19,26)	0,002

Dados expressos em mediana (IQR) ou frequência (%). CYC: ciclofosfamida; RTX: rituximabe.

Com o intuito de minimizar o viés causado pela duração da doença, já que um indivíduo pode vir a desenvolver erosões em qualquer momento no decorrer da doença e que pacientes sem erosão tinham menor tempo de duração da doença em relação aos pacientes com erosão, foi realizada uma subanálise que incluiu apenas os pacientes com mais de 3 anos de doença (n=46 pacientes). Nesta análise, a duração da doença passou a ser similar entre os dois grupos [GPA com erosão: 9 (5-15) anos vs. GPA sem erosão: 12 (4-12) anos - $P=0,13$] e permaneceram independentemente associados ao maior risco de erosões ósseas faciais apenas os

dois polimorfismos citados (genótipo CC vs. genótipos CG e GG em OPG C1181C - $P=0,01$; genótipos AG e GG vs. genótipo AA em RANKL A290G - $P=0,04$) (**Tabela 8**).

TABELA 8. Comparação de variáveis possivelmente associadas ao desenvolvimento de erosões ósseas faciais em pacientes com GPA em uma subanálise incluindo apenas pacientes com tempo de doença >3 anos

	Com erosão (n=27)	Sem erosão (n=19)	P-valor
Tempo de doença (anos)	9 (5-15)	12 (4-12)	0,13
CC em OPG 1181 (rs2073618), n (%)	12	2	0,01
GA/GG em RANKL 290 (rs2277438), n(%)	12	3	0,04
Dose cumulativa de RTX, g	0 (0-6)	0 (0-4)	0,42
Dose cumulativa de CYC, g	7 (0-21,7)	22,5 (0-54)	0,11

Dados expressos em mediana (IQR) ou frequência (%). CYC: ciclofosfamida; RTX: rituximabe.

Com a intenção de investigar uma possível relação entre erosões ósseas faciais e densidade mineral óssea sistêmica, foi realizada a avaliação de pacientes que já haviam sido submetidos a um exame de densitometria óssea (DXA) em algum momento do seguimento. 50 de 90 dos pacientes com GPA (55%) tinham DXA disponíveis. Destes, 13 tinham densidade mineral óssea normal, 19 tinham osteopenia e 18 tinham osteoporose. Não foi encontrada diferença entre as densidades minerais ósseas (em g/cm²) do colo do fêmur, do fêmur total e da coluna

lombar entre pacientes com GPA com e sem erosões ósseas faciais [0,746 vs. 0,637 (p=0,17), 0,906 vs. 0,787 (p=0,5) e 0,855 vs. 0,819 (p=0,3), respectivamente].

As densidades minerais ósseas de colo de fêmur, fêmur total e coluna lombar também foram similares quando comparados pacientes com o genótipo CC do gene OPG 1181, associado à maior frequência de erosões ósseas faciais, com pacientes com os genótipos GC e GG deste gene [colo de fêmur: 0,797 vs. 0,686 g/cm² (p=0,26); fêmur total: 0,916 vs. 0,846 g/cm² (p=0,39); coluna: 0,858 vs. 0,838 g/cm² (p=0,24)]. Da mesma forma, não houve diferença de densidade mineral óssea destes sítios entre pacientes com os genótipos AG e GG do gene RANKL 290, associado à maior frequência de erosões ósseas faciais, e pacientes com o genótipo AA [colo de fêmur: 0,742 vs. 0,688 g/cm² (p=0,97); fêmur total: 0,908 vs. 0,852 g/cm² (p=0,83); coluna: 0,843 vs. 0,844 g/cm² (p=1,0)].

5. DISCUSSÃO

Este estudo com 90 pacientes com GPA e 270 controles pareados por sexo e etnia demonstrou uma associação entre dois polimorfismos de nucleotídeo único localizados nos genes de OPG e RANLK e dano ósseo facial em pacientes com GPA. Ressalta-se que nenhuma diferença foi encontrada na frequência dos polimorfismos estudados comparando pacientes com GPA sem erosões ósseas faciais e controles sem GPA. Entre pacientes com GPA, maior tempo desde o diagnóstico (isto é, maior duração da doença) também se associou à maior frequência de erosões, o que pode ser explicado pelo tempo necessário para o desenvolvimento de erosões. Observou-se também maior frequência do uso de SMZ-TMP no grupo de pacientes com erosões, achado que provavelmente se associa mais à profilaxia de infecções de vias aéreas superiores em pacientes com alterações anatômicas ósseas locais do que à patogênese das erosões propriamente ditas. No entanto, nenhuma outra característica demográfica clínica ou laboratorial, incluindo a abordagem terapêutica, teve impacto no desenvolvimento das alterações óssea faciais neste trabalho.

A presença do alelo G no gene RANKL 290 (rs2277438), seja em heterozigose ou homozigose, teve a maior associação com dano ósseo na GPA, com uma razão de chances de 6,13 (IC 95% 1,95-19,26, P=0,002). Este gene está localizado no íntron 1, uma região potencialmente regulatória do RANKL, e seu efeito na regulação da expressão de RANKL ainda é incerto³⁸. Interessantemente, a presença do alelo G neste gene foi previamente associada com ao risco do desenvolvimento

de espondilite anquilosante, uma doença conhecida por causar destruição óssea, mas, mais tipicamente, neoformação óssea, em uma população chinesa³⁹. Diversos estudos já avaliaram o papel de polimorfismos de nucleotídeo único na artrite reumatoide, uma doença classicamente erosiva. Yang *et al.* demonstrou que um polimorfismo do gene rs2277438 aumenta o risco de AR⁴⁰. Um estudo prévio de Xu *et al.* observou que, apesar deste polimorfismo não ser um fator de susceptibilidade para AR em uma população Han Chinesa, ele pode ter uma influência significativa no dano ósseo e articular da AR⁴¹. Este polimorfismo de RANKL também já foi previamente associado à maior progressão radiográfica em 2 anos em uma coorte japonesa de pacientes com AR precoce⁴².

Em relação ao polimorfismo no gene OPG 1181 (rs2073618), neste trabalho o genótipo CC resultou em um aumento de 3,95 vezes no risco de desenvolver erosões ósseas faciais em pacientes com GPA. Este polimorfismo está localizado no primeiro exon de OPG e substitui uma aspargina por lisina⁴³. Esta alteração pode ter efeito funcional, e assim estar implicada na fisiopatologia da erosão óssea. Em uma grande metanálise de 3 coortes francesas, OPG rs2073618 se mostrou significativamente associado com erosões na artrite reumatoide¹⁵. Outra metanálise de 8 estudos demonstrou que o polimorfismo de OPG G1181C se associa à densidade mineral óssea lombar em europeus e asiáticos, e à densidade mineral óssea de colo femoral e fêmur total em Europeus⁴⁴. De forma semelhante, o SNP OP rs2073618 já se mostrou um preditor de densidade mineral óssea em mulheres indianas, com o genótipo CC resultando em menores valores de densidade⁴⁵. Uma grande coorte de mulheres árabes demonstrou que os genótipos GG e CG se

associaram a uma redução de 40% no risco do desenvolvimento de osteoporose nesta população, quando comparados às pacientes com o genótipo CC. Também se observou que indivíduos com o alelo G tinham risco 30% menor de desenvolver osteoporose do que indivíduos portadores do alelo C⁴⁶, o que é consistente com os resultados do presente estudo, que sugerem que o alelo G provavelmente é protetor contra perda óssea.

O mecanismo exato pelo qual estes polimorfismos levam a alterações osteometabólicas não é completamente conhecido. Ratos transgênicos *OPG-null* desenvolvem osteoporose grave, enquanto ratos com hiper-expressão de OPG desenvolvem um fenótipo de osteopetrose, indicando que a OPG bloqueia a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea⁴⁷. De forma similar, modelos de animais transgênicos com *knockout* do gene de RANKL se apresentam com osteopetrose grave. Estes animais têm um bloqueio completo do desenvolvimento de osteoclastos, que pode ser revertido após a reintrodução do gene RANKL em células progenitoras da medula óssea^{48,49}.

No presente estudo os níveis séricos de OPG e RANKL não foram avaliados, e estudos prévios não correlacionaram os polimorfismos de OPG e RANKL com seus respectivos níveis séricos^{21,50}. O RANKL expresso em células T ativadas pode deflagrar a ativação osteoclástica, e a via RANK/RANKL pode ter um papel importante na destruição óssea induzida por inflamação na artrite. Estudos prévios já indicaram este papel de osteoclastos na erosão óssea em artrite reumatoide e confirmaram a presença de componentes do sistema RANKL na sinóvia

reumatoide⁵¹⁻⁵³. Desta forma, alterações locais na razão RANKL:OPG, mais do que alterações sistêmicas, podem ser determinantes críticos da destruição óssea¹⁴.

Este é o primeiro estudo a analisar polimorfismos de nucleotídeo único relacionados ao metabolismo ósseo em GPA, até o momento. Por este motivo, a maior parte da evidência disponível para estes polimorfismos vem de coortes de pacientes com artrite reumatoide e osteoporose, o que pode enfraquecer esta discussão. Por outro lado, como pontos fortes deste trabalho podem ser citados (1) a amostra representativa de pacientes com uma doença rara, (2) o emprego de critérios classificatórios recém-publicados para GPA e (3) o uso de variáveis binárias de fácil aferição levando a associações fortes. É importante enfatizar que a idade mais avançada do grupo controle não é uma limitação para a análise de polimorfismos que são inatos, e que esta diferença na verdade diminui a chance de um indivíduo do grupo controle vir a desenvolver GPA, o que o colocaria no outro grupo.

6. CONCLUSÕES

Polimorfismos de nucleotídeo único de relacionados ao metabolismo ósseo, especificamente OPG G1181C (rs2073618) e RANKL A290G (rs2277438), podem ter papel no desenvolvimento da rinosinusite destrutiva vista em uma parcela dos pacientes com GPA. A avaliação genética de pacientes com GPA, embora ainda não amplamente disponível na prática clínica, pode vir a ser uma ferramenta útil para identificar indivíduos com maior risco de dano ósseo, aumentando a vigilância sob este aspecto da doença. Este estudo observacional serve como base para o desenvolvimento de estudos maiores para melhor compreensão desta associação e de ensaios clínicos utilizando-se RANKL e OPG como alvos terapêuticos.

7. REFERÊNCIAS

1. Kitching AR, Anders HJ, Basu N, Brouwer E, Gordon J, Jayne DR, Kullman J, Lyons PA, Merkel PA, Savage COS, Specks U, Kain R. ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):71.
2. Banerjee P, Jain A, Kumar U, Senapati S. Epidemiology and genetics of granulomatosis with polyangiitis. *Rheumatol Int*. 2021;41(12):2069-2089.
3. Allard-Chamard H, Liang P. Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies Testing and Interpretation. *Clin Lab Med* 39 (2019) 539–552.
4. Cleary JO, Sivarasan N, Burd C, Connor SEJ. Head and neck manifestations of granulomatosis with polyangiitis. *Br J Radiol*. 2021 Mar 1;94(1119):20200914.
5. Almaani S, Fussner LA, Brodsky S, Meara AS, Jayne D. ANCA-Associated Vasculitis: An Update. *J Clin Med*. 2021;10(7):1446. PMID: 33916214; PMCID: PMC8037363.
6. Akiyama M, Zeisbrich M, Ibrahim N, Ohtsuki S, Berry GJ, Hwang PH, Goronzy JJ and Weyand CM (2019). Neutrophil Extracellular Traps Induce Tissue-Invasive Monocytes in Granulomatosis With Polyangiitis. *Front. Immunol*. 10:2617.
7. Felicetti M, Cazzador D, Padoan R, Pendolino AL, Faccioli C, Nardello E, Berti A, Silvestrini M, Paolazzi G, Brunori G, Zanoletti E, Emanuelli E, Martini A, Schiavon F. Ear, nose and throat involvement in granulomatosis with polyangiitis: how it presents and how it determines disease severity and long-term outcomes. *Clinical Rheumatology*, 2018.

8. Coordes A, Loose SM, Hofmann VM, Hamilton GS 3rd, Riedel F, Menger DJ, Albers AE. Saddle nose deformity and septal perforation in granulomatosis with polyangiitis. *Clin Otolaryngol*. 2018; 43(1):291-299. Epub 2017 Sep 21. PMID: 28881107.
9. Gao LY, Ding J, Zhao LI. Clinicopathologic characteristics of Wegener's granulomatosis: A report of three cases. *Exp Ther Med*. 2016 Apr;11(4):1340-1344. Epub 2016 Feb 3. PMID: 27073446; PMCID: PMC4812588.
10. Holme SS, Kilian K, Eggesbø HB, Moen JM, Molberg Ø. Impact of baseline clinical and radiological features on outcome of chronic rhinosinusitis in granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Res Ther*. 2021;23(1):18. PMID: 33430923; PMCID: PMC7802308.
11. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology*. 1993. PMID: 8140385.
12. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, Vol. 93, 165–176, 1998.
13. Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. *J Bone Miner Metab*. 2021 Jan;39(1):2-11. Epub 2021. Erratum in: *J Bone Miner Metab*. 2021 Jan 13;: PMID: 33389131.
14. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RMR. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res* 38(2) 2005.

15. Ruysen-Witrand A, Degboé Y, Cantagrel A, Nigon D, Lukas C, Scaramuzzino S, Allanore Y, Vittecoq O, Schaevebeke T, Morel J, Sibila J, Cambon-Thomsen A, Dieudé P, Constantin A. Association between RANK, RANKL and OPG polymorphisms with ACPA and erosions in rheumatoid arthritis: results from a metaanalysis involving three French cohorts. *RMD Open* 2016;2:e000226.
16. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000. PMID: 10693864.
17. Pattan V, Kashyap R, Bansal V, Candula N, Koritala T, Surani S. Genomics in medicine: A new era in medicine. *World J Methodol.* 2021 PMID: 34631481; PMCID: PMC8472545.
18. Arko B, Prezelj J, Komel R, Kocijancic A, Hudler P, Marc J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002.
19. Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin gene polymorphism and the risk of osteoporosis and vascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002. PMID: 12213849.
20. Wolski H, Drews K, Bogacz A, Kamiński A, Barlik M, Bartkowiak-Wieczorek J, Klejewski A, Ożarowski M, Majchrzycki M, Seremak-Mrozikiewicz A. The RANKL/RANK/OPG signal trail: significance of genetic polymorphisms in the etiology of postmenopausal osteoporosis. *Ginekol Pol.* 2016. PMID: 27304650.

21. Pereira, R.M.R., Figueiredo, C.P., Cha, C.C. et al. Associations between OPG and RANKL polymorphisms, vertebral fractures, and abdominal aortic calcification in community-dwelling older subjects: the Sao Paulo Ageing & Health Study (SPAH). *Osteoporos Int* 27, 3319–3329 (2016).
22. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, Calabrese LH, Fries JF, Lie JT, Lightfoot RW Jr, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 1990. PMID: 2202308.
23. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, Flores-Suarez LF, Gross WL, Guillevin L, Hagen EC, Hoffman GS, Jayne DR, Kallenberg CG, Lamprecht P, Langford CA, Luqmani RA, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Ozen S, Pusey CD, Rasmussen N, Rees AJ, Scott DG, Specks U, Stone JH, Takahashi K, Watts RA. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013.
24. Robson JC, Grayson PC, Ponte C, Suppiah R, Craven A, Judge A, Khalid S, Hutchings A, Watts RA, Merkel PA, Luqmani RA; DCVAS Investigators. 2022 American College of Rheumatology/European Alliance of Associations for Rheumatology classification criteria for granulomatosis with polyangiitis. *Ann Rheum Dis.* 2022. PMID: 35110333.
25. Lopes JB, Danilevicius CF, Takayama L, Caparbo VF, Menezes PR, Scazufca M, Kuroishi ME, Pereira RM. Prevalence and risk factors of radiographic vertebral fracture in Brazilian community-dwelling elderly. *Osteoporos Int.* 2011 PMID: 20442985.

26. Domiciano DS, Machado LG, Lopes JB, Figueiredo CP, Caparbo VF, Takayama L, Oliveira RM, Menezes PR, Pereira RM. Incidence and risk factors for osteoporotic vertebral fracture in low-income community-dwelling elderly: a population-based prospective cohort study in Brazil. The São Paulo Ageing & Health (SPAH) Study. *Osteoporos Int.* 2014. PMID: 25092058.
27. Domiciano DS, Machado LG, Figueiredo CP, Caparbo VF, Oliveira RM, Menezes PR, Pereira RMR. Incidence and risk factors for osteoporotic non-vertebral fracture in low-income community-dwelling elderly: a population-based prospective cohort study in Brazil. The São Paulo Ageing and Health (SPAH) study. *Osteoporos Int.* 2021. PMID: 33037462.
28. Lopes JB, Fernandes GH, Takayama L, Figueiredo CP, Pereira RM. A predictive model of vitamin D insufficiency in older community people: from the São Paulo Aging & Health Study (SPAH). *Maturitas.* 2014. PMID: 24985066.
29. 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.
30. Mencej-Bedrač S, Preželj J, Marc J. TNFRSF11B gene polymorphisms 1181G > C and 245T > G as well as haplotype CT influence bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas.* 2011;69(3):263-267.
31. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* 2002;17(7):1245-1255.

32. Piedra M, García-Unzueta MT, Berja A, et al. "Single nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density". *BMC Med Genet.* 2011;12:168.
33. Nguyen TV, Eisman JA. Genetic profiling and individualized assessment of fracture risk. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(3):153-161.
34. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet.* 2005;76(5):887-893.
35. González JR, Armengol L, Solé X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics.* 2007;23(5):644-645.
36. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
37. Hellmich, B., Flossmann, O., Gross, W. L., Bacon, P., Cohen-Tervaert, J. W., Guillevin, L., Jayne, D., Mahr, A., Merkel, P. A., Raspe, H., Scott, D. G., Witter, J., Yazici, H., & Luqmani, R. A. (2007). EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Annals of the rheumatic diseases*, 66(5), 605–617.
38. Assmann, G., Koenig, J., Pfreundschuh, M., Epplen, J. T., Kekow, J., Roemer, K., & Wieczorek, S. (2010). Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study. *The Journal of rheumatology*, 37(5), 900–904. Xu S, Ma XX, Hu LW, Peng LP, Pan FM, Xu JH. Single nucleotide polymorphism of RANKL and OPG genes may play a role in

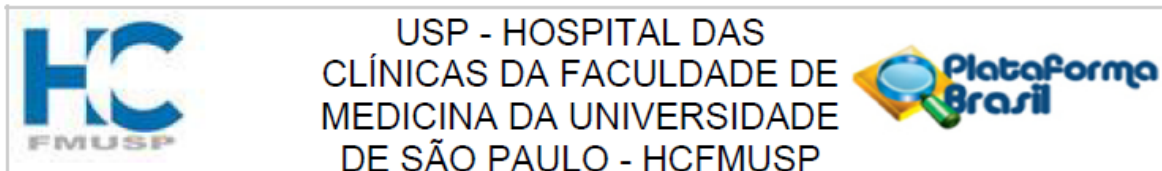
- bone and joint injury in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2014. PMID: 25068378.
39. Qian, B. P., Wang, X. Q., Qiu, Y., Jiang, J., Ji, M. L., & Feng, F. (2014). Association of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) gene polymorphisms with the susceptibility to ankylosing spondylitis: a case-control study. *Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association*, 19(2), 207–212.
 40. Yang, H., Liu, W., Zhou, X., Rui, H., Zhang, H., & Liu, R. (2019). The association between RANK, RANKL and OPG gene polymorphisms and the risk of rheumatoid arthritis: a case-controlled study and meta-analysis. *Bioscience reports*, 39(6), BSR20182356.
 41. Xu, S., Ma, X. X., Hu, L. W., Peng, L. P., Pan, F. M., & Xu, J. H. (2014). Single nucleotide polymorphism of RANKL and OPG genes may play a role in bone and joint injury in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*, 32(5), 697–704.
 42. Furuya, T., Hakoda, M., Ichikawa, N., Higami, K., Nanke, Y., Yago, T., Kamatani, N., & Kotake, S. (2007). Associations between HLA-DRB1, RANK, RANKL, OPG, and IL-17 genotypes and disease severity phenotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*, 26(12), 2137–2141.
 43. Nava-Valdivia, C. A., Saldaña-Cruz, A. M., Corona-Sanchez, E. G., Murillo-Vazquez, J. D., Moran-Moguel, M. C., Salazar-Paramo, M., Perez-Guerrero, E. E., Vazquez-Villegas, M. L., Bonilla-Lara, D., Rocha-Muñoz, A. D., Martín-

- Marquez, B. T., Sandoval-Garcia, F., Martínez-García, E. A., Fajardo-Robledo, N. S., Ponce-Guarneros, J. M., Ramirez-Villafaña, M., Alcaraz-Lopez, M. F., Gonzalez-Lopez, L., & Gamez-Nava, J. I. (2017). Polymorphism rs2073618 of the TNFRSF11B (OPG) Gene and Bone Mineral Density in Mexican Women with Rheumatoid Arthritis. *Journal of immunology research*, 2017, 7680434.
44. Lee, Y. H., Woo, J. H., Choi, S. J., Ji, J. D., & Song, G. G. (2010). Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. *Molecular biology reports*, 37(1), 227–234.
45. Nair, S., Bhadriraja, H., Patil, A., Surve, S., Joshi, B., Balasinor, N., & Desai, M. (2022). Association of OPG and RANKL gene polymorphisms with bone mineral density in Indian women. *Gene*, 840, 146746.
46. Abdi, S., Binbaz, R. A., Mohammed, A. K., Ansari, M. G. A., Wani, K., Amer, O. E., Alnaami, A. M., Aljohani, N., & Al-Daghri, N. M. (2021). Association of RANKL and OPG Gene Polymorphism in Arab Women with and without Osteoporosis. *Genes*, 12(2), 200.
47. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D & Galibert L (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390: 175-179.
48. Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A. J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Mak, T. W., Boyle, W. J., & Penninger, J. M.

- (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397(6717), 315–323.
49. Li J, Sarosi I & Yan XO (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97: 1566-1571.
50. Bonfá AC, Seguro LP, Caparbo V, Bonfá E, Pereira RM. RANKL and OPG gene polymorphisms: associations with vertebral fractures and bone mineral density in premenopausal systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int*. 2015;26(5):1563-1571.
51. Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E & Goldring SR (2000). Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis and Rheumatism*, 43: 250-258.
52. Itonaga I, Fujikawa Y, Sabokbar A, Murray DW & Athanasou NA (2000). Rheumatoid arthritis synovial macrophage-osteoclast differentiation is osteoprotegerin ligand-dependent. *Journal of Pathology*, 192: 97-104.
53. Takayanagi H, Oda H, Yamamoto S, Kawaguchi H, Tanaka S, Nishikawa T & Koshihara Y (1997). A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis; synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240: 279-286.

8. ANEXOS

8.1 Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos Polimorfismos Genéticos de OPG, RANK e RANKL em Pacientes com Granulomatose com Poliangiite com Erosões Ósseas Faciais

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: 1

CAAE: 50007521.1.0000.0068

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: 4.916.501

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1783241.pdf	21/07/2021 10:11:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	21/07/2021 10:11:08	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	Declaracao_de_financiamento_do_projeto.pdf	20/07/2021 07:48:17	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_MARILIA.pdf	20/07/2021 07:22:23	Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	TERMO_DE_USO_DE_DADOS.pdf	20/07/2021 07:21:33	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	Carta_de_aprovacao_CM.pdf	20/07/2021 07:19:54	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Marilia_Junho_2021_Versao_Final.docx	20/07/2021 07:18:02	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	20/07/2021 07:15:58	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Folha de Rosto	FR_ROSA_MARIA_RODRIGUES_PEREIRA_20912.pdf	20/07/2021 07:15:39	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 19 de Agosto de 2021

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

8.2 Submissão para publicação do presente estudo



Marília Ambiel Dagostin <marilia.ambiel@gmail.com>

SAR-D-23-00705 - Confirming your submission to Seminars in Arthritis and Rheumatism

1 mensagem

Seminars in Arthritis and Rheumatism <em@editorialmanager.com> 18 de setembro de 2023 às 15:30
Responder a: Seminars in Arthritis and Rheumatism <arthandrheum@stellarmed.com>
Para: Marília Ambiel Dagostin Furquim <marilia.ambiel@gmail.com>

This is an automated message.

Association between osteoprotegerin and RANKL single nucleotide polymorphisms and destructive rhinosinusitis in patients with granulomatosis with polyangiitis

Dear Mrs Furquim,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Seminars in Arthritis and Rheumatism. It has been assigned the following manuscript number: SAR-D-23-00705.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/ysarh/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Seminars in Arthritis and Rheumatism