

Dina Maria Abade Lopes

**Sarcoidose e marcadores genéticos na região MHC-6p21.3 -
avaliação da suscetibilidade, apresentação clínica e curso da
doença**

Implicação Médico - Legal

Dissertação do Ciclo de estudos conducente ao grau de mestre em
Medicina Legal do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar,
Universidade do Porto

Os orientadores,

Prof^ª. Doutora Berta Martins da Silva
(Unidade Multidisciplinar de Investigação
Biomédica, Instituto Ciências Biomédicas de Abel Salazar,
Universidade do Porto)

Mestre Andreia Bettencourt
(Unidade Multidisciplinar de Investigação
Biomédica, Instituto Ciências Biomédicas de Abel Salazar,
Universidade do Porto)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o contributo de várias pessoas que direta ou indiretamente possibilitaram o seu desenvolvimento, e às quais não posso deixar de prestar o meu agradecimento.

À Comissão Coordenadora do Mestrado em Medicina Legal, em especial à Professora Doutora Maria José Pinto da Costa, pela oportunidade em frequentar este ciclo de estudos.

À Professora Doutora Berta Martins, por toda a ajuda prestada ao longo da realização deste trabalho. Pelo apoio e incentivo, paciência, compreensão e tolerância nos momentos mais difíceis. Com a Professora tive oportunidade não só de enriquecer os meus conhecimentos como também crescer enquanto pessoa.

À minha co-orientadora, Mestre Andreia Bettencourt um agradecimento especial, pela compreensão, ajuda, disponibilidade. Obrigado por tudo!

À Dr.^a Sofia, por me ter dado todo o suporte clínico necessário, pelas correções clínicas e pelo apoio demonstrado. Muito Obrigado!

Agradeço às Mestres Sandra Maia, Oriana Marques, e à D. Maria Rebelo pela simpatia, boa disposição e incentivos.

Agradeço o apoio e a boa disposição da “Boleixinha”, Joana e Daniela C. minhas colegas de mestrado.

À Mestre Cláudia Carvalho e à Mestre Bárbara Leal, agradeço toda a ajuda.

Aos amigos que estiveram sempre presentes, até mesmo nos momentos menos bons, um obrigado e um grande beijinho pela força, incentivo, apoio e compreensão.

Ao meu marido, por ter de me aturar nestes momentos mais difíceis, pelo apoio e incentivos que sempre demonstrou.

Agradeço em especial aos meus pais, pois sem eles não seria possível a concretização deste projeto. O meu muito obrigado, por tudo aquilo que fazem por mim. Um beijinho do tamanho do mundo!

Parte dos resultados observados foram apresentados em formato de poster no Symposium “Chronic Inflammatory Disorders of the Lung”, realizado em Freiburg, Alemanha, 28 e 29 de Setembro de 2012.

Sofia Neves, **Dina Lopes**, António Morais, Cláudia Carvalho, Andreia Bettencourt, Barbara Leal, Patrícia Mota, M^a Brito, Sílvia Torres, Sandra Maia, Paulo P Costa; Berta M Silva; *Associations of HLA-DRB1 genotype with clinical expression of sarcoidosis in portuguese patients*; 2012

RESUMO

A sarcoidose é uma doença sistémica, que se caracteriza por uma inflamação granulomatosa, que atinge os pulmões (90%), coração, sistema linfático, pele, olhos e cérebro, cuja incidência varia de acordo com a idade, género, etnia e origem geográfica. Afeta preferencialmente jovens adultos, ainda que crianças também desenvolvam sarcoidose.

A apresentação clínica da doença é variável, podendo ser assintomática, aguda ou insidiosa. Cerca de 30% dos indivíduos afetados manifesta um quadro clínico distinto, denominado de Síndrome de Löfgren, que se caracteriza pela presença de eritema nodoso, poliartralgias e adenopatias hilares bilaterais e/ou paratraqueais. Normalmente estes doentes têm bom prognóstico.

Os sintomas mais comuns na sarcoidose são perda de peso, tosse, dispneia (casos graves), artralgias e cansaço. O diagnóstico geralmente é estabelecido com base em alterações radiográficas e exames histopatológicos.

A etiologia da sarcoidose permanece desconhecida, apesar de terem sido implicados agentes infecciosos e fatores ambientais e ocupacionais. A exposição do doente a determinados agentes desencadeantes é sempre questionada pelo médico. De facto, o contacto permanente do paciente com esses agentes desencadeantes pode implicar possíveis limitações na sua vida profissional e social, pelo que esse contacto deve ser evitado. Neste contexto a legislação portuguesa contempla, através da tabela nacional de incapacidades, (temporárias ou permanentes) o grau de incapacidade devido as limitações físicas e psíquicas.

A agregação familiar e a alta prevalência e incidência da sarcoidose em alguns grupos étnicos, sugerem a contribuição de fatores genéticos. Genes HLA da classe II do *locus* DRB1, em particular HLA-DRB1*03 e HLA-DRB1*15, têm sido associados a um risco acrescido e a diferentes fenótipos da doença.

Genes não-HLA localizados na região MHC também têm sido descritos como tendo um papel importante na apresentação clínica e no fenótipo da sarcoidose, nomeadamente o gene *Butyrophilin like 2* (BTNL2). Diversos estudos têm demonstrado associação do alelo A do polimorfismo rs2076530 (G/A) do gene BTNL2 com um aumento da suscetibilidade à doença.

Neste trabalho procuramos responder a três questões:

- Qual o contributo da identificação dos alelos do *locus* HLA-DRB1 e do polimorfismo rs2076530, na decisão da atribuição de incapacidade por doença profissional?
- Qual o contributo desses polimorfismos para o risco de desenvolver sarcoidose?
- Estão estes genes implicados na apresentação clínica e curso da doença?

Neste estudo, foram investigados 106 doentes com sarcoidose, proveniente da região norte do país. Os doentes foram recrutados da consulta externa da Unidade de Pneumologia do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia e Espinho e do Hospital de São João. Foram recolhidos dados clínicos e demográficos, como a idade e o sexo. A população controlo era constituída por 282 indivíduos para análise genética dos alelos HLA-classe II. Para determinação das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2076530 foi utilizada uma população controlo constituída por 118 indivíduos. Ambos os grupos controlo eram constituídos por indivíduos saudáveis sem patologia conhecida.

Neste trabalho verificou-se que a frequência do alelo HLA-DRB1*01 em doentes estava significativamente diminuída, quando comparada com a população controlo (10% vs 23%, OR = 0,379, IC = 0,192-0,750, $p = 0,004$). Considerando doentes com Síndrome de Löfgren e doentes não-Löfgren, verificou-se que a frequência do alelo DRB1*01 estava aumentada nos doentes Löfgren (25% vs 7%; OR = 0,225; IC = 0,061-0,833, $p = 0,017$). Quando comparamos doentes Löfgren com população controlo, a frequência do alelo DRB1*03 estava significativamente aumentada nos doentes (35% vs 16%, OR = 2,913, IC = 1,100-7,710, $p = 0,025$), ao contrário do alelo DRB1*04, cuja frequência estava diminuída no mesmo grupo (5% vs 24%, OR=0,162, IC=0,021-1,236; $p=0,046$).

Quando comparadas as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2076530 entre doentes e população controlo, não foram encontradas associações estatisticamente significativas. Também não foram encontradas associações estatisticamente significativas quando comparamos doentes Löfgren vs doentes não-Löfgren.

Este estudo revela a importância da estratificação dos doentes na determinação do risco e fenótipo da doença. A tipagem HLA pode ser útil para prever a expressão clínica da sarcoidose. Associações específicas com alelos HLA podem ter implicações no acompanhamento e tratamento do doente.

Não encontramos associação da doença com o polimorfismo rs2076530. No entanto, as frequências observadas são semelhantes às obtidas por outro investigador [Morais et al., *Respir Med*, 2012. **106**(12):1771] numa população portuguesa, que, numa amostra de maior dimensão, demonstrou uma associação significativa. Ainda não é claro o eventual papel da BTNL2 na patogénese da sarcoidose. Uma hipótese que tem sido avançada é que esta associação pode ser o resultado de desequilíbrio de ligação deste polimorfismo com alelos HLA-classe II.

Em doentes com contacto frequente com agentes causais, a genotipagem poderá ser importante para determinar o tipo de acompanhamento e tratamento. Marcadores genéticos associados a um pior prognóstico, podem ser úteis para determinar a probabilidade de o doente vir a desenvolver incapacidade temporária e/ou permanente, devido a complicações psicológicas, respiratórias ou neurológicas, entre outras.

ABSTRACT

Sarcoidosis is a systemic disease that is characterized by granulomatous inflammation affecting the lungs (90%), heart, lymphatic system, skin, eyes and brain. Disease presentation varies with age, gender, ethnicity and geographic origin. It preferentially affects young adults, although children also develop sarcoidosis. About 30% of individuals manifest a clinical distinct presentation, the Lofgren's Syndrome, which is characterized by the presence of erythema nodosum, bilateral hilar or paratracheal lymphadenopathies and polyarthralgia. Usually these patients have good prognosis.

The most common symptoms are weight loss, cough, dyspnea (in severe cases), arthralgia and fatigue. The diagnosis is usually established on the basis of radiographic and histopathological examinations.

Although infectious agents and occupational and environmental factors have been implicated, the etiology of sarcoidosis remains unknown. The exposure of the patient to certain triggering agents is always investigated by the doctor, because restrictions to personal and professional life may be warranted, as prolonged contact with any causative agent is to be avoided. In this context the Portuguese legislation contemplates, through the national table of disabilities (temporary or permanent), the degree of disability due to physical and psychological limitations.

Familial aggregation and the high prevalence and incidence in some ethnic groups suggest an important contribution of genetic factors. HLA - DRB1, particularly HLA-DRB1*03 and HLA-DRB1*15, have been associated with disease risk and with different phenotypes of sarcoidosis.

Non-HLA genes positioned in the MHC region have also been described as having an important role in the clinical presentation of sarcoidosis, and in its phenotype, such as the Butyrophilin like 2 (BTNL2) gene. Several studies have demonstrated association of the A allele of the polymorphism rs2076530 BTNL2 gene with disease susceptibility.

This study aims to answer three questions:

- What is the contribution of the HLA-DRB1 alleles and of the rs2076530 polymorphism for the decision to award disease disability for occupational disease?
- What is the contribution of these polymorphisms to the risk of developing sarcoidosis?
- Are these genes involved in the clinical presentation and course of the disease?

This study investigated 106 patients with sarcoidosis, from the north of the country. Patients were recruited from the outpatient clinic of the *Unidade de Pneumologia do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia e Espinho* and of *Hospital de São João*. Clinical and demographic data such as age and sex was collected. The control population for genetic analysis of HLA- class II comprised 282 subjects. For determination of rs2076530 allele and genotype frequencies the control population consisted of 118 individuals. Control groups consisted of healthy individuals with no known pathology.

In this work it was found that the frequency of the HLA-DRB1*01 allele was significantly decreased in patients when compared to the control population (10% vs. 23%, OR = 0.379, CI = 0.192 to 0.750, $p = 0.004$). We also found that the DRB1*01 allele frequency was increased in Lofgren patients (25 % vs. 7%, OR = 0.225 CI = 0.061 to 0.833, $p = 0.017$). When comparing patients with Lofgren with the control population, the frequency of DRB1*03 allele was significantly increased in patients (35 % vs 16 %, OR = 2.913, CI = 1.100 to 7.710, $p = 0.025$), unlike the DRB1*04 allele, which frequency was decreased in the same group (5% vs. 24%, OR = 0.162 CI 0.021-1 -0, 236, $p = 0.046$).

When comparing the genotypic and allelic frequencies of the rs2076530 polymorphism between patients and control population, we found no statistically significant associations. We also found no statistically significant associations when comparing patients with Lofgren Syndrome and patients without Lofgren Syndrome.

This study highlights the importance of stratification of patients to determine disease risk and phenotype. HLA typing may be useful to predict the clinical manifestations of sarcoidosis. Associations with specific HLA alleles may have implications for patient treatment and follow-up.

We found no association of the disease with the rs2076530 polymorphism; however, the observed frequencies are similar to those reported by another researcher [Morais et al., *Respir Med*, 2012. **106**(12):1771] in a Portuguese population. In a larger sample, they were able to demonstrate a significative association. It is not clear yet what role BTNL2 may play in the pathogenesis of sarcoidosis. It has been hypothesized that it could be the result of linkage disequilibrium with HLA-class II alleles.

In sarcoidosis patients who develop the disease due to exposure to particular agents, genetic typing could be important in patient management. Genetic markers associated with poorer prognosis, may prove useful to determine the likelihood that the patient will develop temporary and/or permanent disability due to psychological, respiratory, or neurological complications, among others.

INDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ii
PUBLICAÇÕES	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv

I. INTRODUÇÃO

1.1 Incidência e prevalência da sarcoidose	2
1.1.1 Variação da prevalência de acordo com a idade, etnia e sexo.....	3
1.1.2 Incidência e prevalência em crianças	4
1.2 Características clínicas da sarcoidose	4
1.3 Envolvimento sistêmico da sarcoidose	4
1.3.1 Envolvimento pulmonar	4
1.3.2 Envolvimento do sistema linfático	5
1.3.3 Envolvimento cutâneo	6
1.3.4 Envolvimento neurológico	6
1.3.5 Envolvimento ocular	7
1.3.6 Envolvimento cardíaco	8
1.3.7 Envolvimento do fígado e pâncreas	8
1.3.8 Envolvimento renal	8
1.4 Diagnóstico da sarcoidose	8
1.4.1 Exames complementares de diagnóstico	9
1.5 Tratamento	10
1.6 Fatores desencadeantes da sarcoidose	10
1.6.1 Agentes infecciosos	11
1.6.1.1 Mycobacterium	11
1.6.1.2 Propionibacterium acnes	11
1.6.1.3 Vírus	11
1.6.2 Fatores ambientais	12
1.7 Imunopatogênese	13
1.8 Sarcoidose e fatores genéticos	14
1.8.1 Sarcoidose e genes HLA	15
1.8.2 Sarcoidose e genes não-HLA	17

1.9	Sarcoidose e implicações médico-legais	18
II.	OBJETIVOS	22
III.	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	População do estudo	24
3.1.1	Características clínicas	24
3.2	Amostras Biológicas	24
3.3	Estudos genéticos	25
3.3.1	Estudos de associação	25
3.4	Extração DNA: método “salting-out”	25
3.5	Isolamento e quantificação do DNA	26
3.6	Amplificação do DNA para genotipagem dos alelos HLA-DRB1.....	27
3.7	PCR em tempo real para amplificação do rs2076530	28
3.8	Análise estatística	30
IV.	RESULTADOS	32
4.1	Características dos doentes	32
4.2	Identificação dos alelos do locus HLA-DRB1.....	32
4.2.1	Doentes vs população controlo	32
4.2.2	Doentes Lofgren vs doentes não-Lofgren	33
4.2.3	Doentes Lofgren vs População controlo	34
4.3	Tipagem do polimorfismo rs2076530 do gene BTNL2	35
4.3.1	Doentes vs população controlo	35
4.3.2	Doentes não-Lofgren vs doentes Lofgren	36
V.	DISCUSSÃO	38
VI.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	42
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidência e prevalência da sarcoidose em relação a etnia e sexo	3
Figura 2. Lesões cutâneas	6
Figura 3. Esquema proposto para abordagem de diagnóstico na sarcoidose	9
Figura 4. Resposta inflamatória na sarcoidose	14
Figura 5. Constituição do granuloma sarcoidótico	14
Figura 6. Cromossoma 6 e região MHC	14
Figura 7. Localização do gene BTNL2 no cromossoma 6	17
Figura 8. Representação esquemática da detecção pela simpleprobe	29
Figura 9. Curvas de melting; picos de melting	30

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação radiológica de scadding	5
Tabela 2. Manifestações clínicas da neurosarcoidose e o seu prognóstico	7
Tabela 3. Exposições ambientais e ocupacionais com ou sem associação com a sarcoidose.....	12
Tabela 4. Condições amplificação do locus HLA-DRB1	28
Tabela 5. Características fenotípicas da população de doentes	32
Tabela 6. Frequência alélica do locus DRB1 doentes vs população controlo	32
Tabela 7. Frequências alélicas do locus DRB1 doentes Lofgren vs doentes não-Lofgren	33
Tabela 8. Frequências alélicas do locus DRB1 doentes Lofgren vs população controlo	34
Tabela 9. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2076530 do gene BTNL2 entre doentes e população controlo	35
Tabela 10. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2076530 do gene BTNL2 entre doentes não-Lofgren e doentes Lofgren	36

ABREVIATURAS E SIMBOLOS

EUA	Estados Unidos da América	rs	Polimorfismo
WASOG	World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous disease	°C	Graus Celsius
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar	mL	Mililitros
LBA	Lavado Bronco-Alveolar	TE	Tris-EDTA
EDC	Exames Complementares de Diagnóstico	PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
TAC	Tomografia Axonal Computorizada	dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfatos
PET-CT	Positron Emission Tomography-Computed Tomography	RCLB	Tampão de Lise de Eritrócitos
F-FDG	2-deoxy-2-(¹⁸ F)fluoro-D-glucose	EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
RMN	Ressonância Magnética Nuclear	SDS	Dodecil sulfato de sódio
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina	ddH₂O	Água bi-destilada
TNF-α	Tumor Necrosis Factor -α	TE₂	Tris-EDTA 2x
DNA	Ácido desoxirribonucleico	MgCl₂	Cloreto de Magnésio
Th	T-helper	NaCl	Cloreto de Sódio
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos	μL	Microlitro
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1	μM	Micromolar
EBV	Epstein-Barr Vírus	SSP	Sequence Specific Primers
HHV	Human Herpes Virus	OR	Odds Ratio
ACCESS	A case controlled etiologic study of sarcoidosis	p	Significância estatística
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade	vs	<i>versus</i>
IL	Interleucina	Mb	Mega pares de bases
HLA	Antígeno Leucocitário Humano	SNPs	Single Nucleotide Polimorphisms
BTNL2	Butirofilina-2	ng	Nanogramas

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A Sarcoidose é uma doença granulomatosa inflamatória de etiologia desconhecida, que afeta preferencialmente os pulmões, sistema linfático, coração, pele, sistema nervoso central e olhos. A sarcoidose representa uma doença multissistêmica e clinicamente relevante. A sua etiopatogenia não está esclarecida, ainda que estudos efetuados nos últimos anos tenham evidenciado uma resposta imune alterada, desencadeada por antígenos inespecíficos em indivíduos geneticamente suscetíveis. Vários agentes etiológicos, incluindo organismos microbianos e agentes ambientais têm sido referenciados como causadores da doença, mas sem resultados conclusivos. Diferenças na incidência da doença entre grupos étnicos e a agregação familiar suportam a hipótese de que o envolvimento genético existe.

1.1 Incidência e prevalência da sarcoidose

A sarcoidose é uma doença de incidência mundial afetando pessoas de todas as idades, gêneros e etnias[1]. A apresentação clínica da doença é variável existindo mesmo uma elevada percentagem de indivíduos que nunca manifestam a doença [2].

Têm sido adotados ao longo dos anos vários métodos na tentativa de melhor caracterizar a dimensão da doença. O rastreio em massa com radiografia do tórax foi dos primeiros métodos utilizados, dado que 90% dos doentes apresentam alterações radiográficas [3]. Na Finlândia a prevalência encontrada foi de 28.2/100 000 habitantes e a incidência foi de 11.4/100 000 habitantes. O recurso a registo de bases de dados nacionais permitiu calcular a incidência da sarcoidose na região noroeste dos Estados Unidos da América (EUA), em cerca de 4,8 casos/100 000 habitantes. Na Dinamarca, o recurso ao registo nacional de doentes (entre os anos de 1980-1994), o qual continha informações sobre idade, sexo e residência permitiu identificar cerca de 7.2 casos/100 000 habitantes. Foi ainda reportada uma diferença na incidência da doença entre a região Oeste (8.4/100 000) e a região Este (5.7/100 000) do país[4].

Na Bélgica o recurso ao método de questionários standardizados, acessíveis a todos os pneumologistas e com critérios de diagnóstico específico de sarcoidose, permitiu calcular a prevalência da doença em 1.33 casos/100 000 habitantes e uma incidência de 0.17/100 000 habitantes[5]. Iamaguchi e colaboradores, utilizaram o mesmo método numa população japonesa, nos anos de 1972 e 1984, comparando assim a evolução da doença ao longo do tempo. Os resultados demonstraram que em 1972 existia uma prevalência de 3.0/100 000 nos homens e uma prevalência de

3.3/100 000 nas mulheres. Em 1984, verificou que a prevalência da sarcoidose tinha aumentado para 3.8/100 000 nos homens e para 5.6/100 000 nas mulheres[6].

O recurso a registo de autópsias também permitiu determinar a prevalência e/ou incidência da sarcoidose. Em 1964, Hagerstrand e Linell descreveram 43 casos de sarcoidose detetados em 6706 autópsias, numa população sueca [7]. Nos EUA uma revisão de ficheiros médico-legais num período de sete anos, revelou que em 9324 autópsias existiam 31 casos de sarcoidose com envolvimento cardíaco [8].

Em Portugal a verdadeira incidência/prevalência da doença não é conhecida.

1.1.1 Variação da prevalência e incidência de acordo com a idade, etnia e sexo

A incidência da sarcoidose é superior nos afro-americanos cerca de 35.5 casos/100.000 habitantes enquanto nos indivíduos de descendência europeia é de apenas 10.6/100.000 habitantes. Verifica-se também que a incidência da doença é consistentemente mais elevada em mulheres afro-americanas (39.1/100 000) quando comparadas com homens afro-americanos (29.8/100 000). A incidência é menor em indivíduos de descendência europeia (fig. 1)[9].

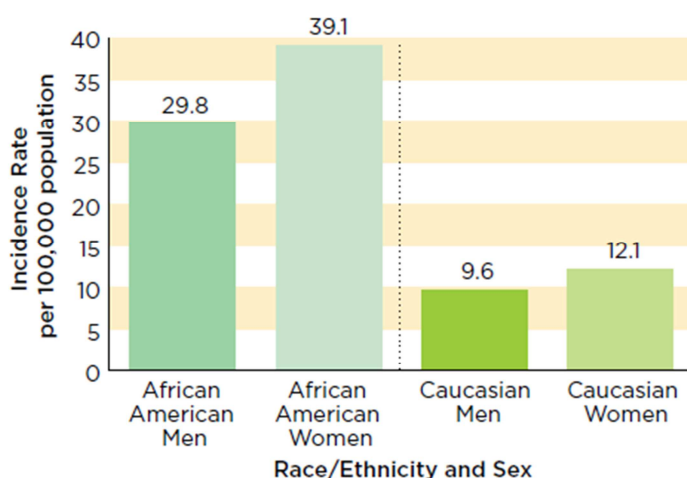


Figura 1. Incidência da sarcoidose na relação etnia e sexo. Adaptado de: Rybicki et al, 1997

Byg e colaboradores descreveram, numa população dinamarquesa, uma diferença da incidência da sarcoidose de acordo com o sexo e a idade. Nos homens o pico de incidência da doença verificava-se entre os 30 e os 34 anos (14.8/100 000) e nas mulheres entre os 25-29 e os 65-69 anos (10.5/100 000 e 11/100 000 respetivamente)[4].

1.1.2 Incidência e prevalência em crianças

A sarcoidose é pouco comum em crianças. Um estudo realizado na Dinamarca concluiu que a incidência da doença era de 0.06 casos/100 000 habitantes em crianças com menos de 4 anos e de 1.02 casos/100 000 habitantes em crianças entre os 14 e os 15 anos [10].

1.2 Características clínicas da sarcoidose

A característica clínica mais visível na sarcoidose são os granulomas epitelioides não caseosos encontrados em vários órgãos (fig. 2). A sarcoidose pode apresentar-se de forma assintomática, aguda e/ou insidiosa. Os doentes quando assintomáticos são diagnosticados através de radiografias pulmonares realizadas durante exames de rotina. [1]. A forma aguda desenvolve-se de maneira abrupta, num período de poucas semanas e representa cerca de 20 a 40% do total dos casos de sarcoidose. Os principais sintomas são febre, suores noturnos, fadiga e perda de peso; em casos mais graves existe desconforto abdominal, dispneia, tosse e toracalgia [1, 11]. Cerca de 30% dos indivíduos manifesta um quadro clínico distinto, denominado de **Síndrome de Lofgren**, que se caracteriza pela presença de eritema nodoso, poliartralgias e adenopatias hilares bilaterais e/ou paratraqueais. A apresentação clínica é distinta entre homens e mulheres. O eritema nodoso observa-se predominantemente em mulheres enquanto nos homens são comuns poliartrites inflamatórias do tornozelo. Dois terços destes doentes apresentam remissão após três anos de diagnóstico, sem sequelas ou consequências [12, 13], sendo por isso considerada uma forma menos severa da doença.

A forma insidiosa da sarcoidose desenvolve-se ao longo do tempo (meses) e traduz-se por queixas respiratórias sem sintomas constitucionais. Estes doentes frequentemente desenvolvem sarcoidose crónica, com lesões permanentes nos pulmões e outros órgãos, ocorrendo a morte em 1-6% dos casos [14, 15].

1.3 Envolvimento sistémico da sarcoidose

1.3.1 Envolvimento pulmonar

A sarcoidose pulmonar é uma doença intersticial, na qual o processo inflamatório pode envolver os alvéolos, brônquios e pequenos vasos sanguíneos.

Verificam-se alterações na telerradiografia pulmonar em 86 a 92% dos doentes. O estadiamento radiológico na sarcoidose é baseado na presença de adenopatias e alterações parenquimatosas pulmonares com ou sem fibrose (tabela 1)[16]. As adenopatias são tipicamente hilares, bilaterais, simétricas e não compressivas enquanto o envolvimento pulmonar é habitualmente bilateral, simétrico e difuso[17]. Estes critérios foram estabelecidos pela WASOG (World Associations of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disease), em 1958 e é usada ainda hoje.

Tabela 1. Classificação Radiológica de scadding

Estádios da sarcoidose	
Estadio 0	Inexistência de achados intra-torácicos
Estadio I	Adenopatias
Estadio II	Envolvimento parenquimatoso e adenopatia
Estadio III	Envolvimento parenquimatoso sem adenopatia
Estadio IV	Fibrose pulmonar

A probabilidade de remissão espontânea depende do estadio radiológico inicial. Dos doentes no estadio I, 55 a 90% evoluem para cura; no estadio II, 40 a 70% evoluem para cura; no estadio III, 10 a 20% evoluem para cura e no estadio IV não há cura[16].

Os sintomas mais comuns incluem tosse, desconforto no peito e nas formas mais avançadas da doença a dispneia é a queixa mais comum. Cerca de 65% dos doentes apresenta alteração ventilatória restritiva e 50% doença obstrutiva. Apesar de geralmente estar associada a fibrose, a hipertensão arterial pulmonar (HAP) pode ocorrer em qualquer estadio da doença. O envolvimento da circulação pulmonar associa-se a uma alta taxa de morbi-mortalidade, sendo a taxa de sobrevivência destes indivíduos inferior em comparação com indivíduos sem HAP (59% vs 96%)[18].

1.3.2 Envolvimento sistema linfático

A sarcoidose com envolvimento do sistema linfático afeta sobretudo a zona cervical, pulmonar, axilar e inguinal. A adenomegalia é discreta, indolor e móvel. A

esplenomegalia é mínima e silenciosa, mas pode causar sensação de pressão no abdômen, anemia, leucopenia e trombocitopenia [19-21].

1.3.3 Envolvimento cutâneo

O envolvimento da pele é comum, afetando cerca de 25 a 35% dos doentes. As lesões sarcoides na pele permitem efetuar um diagnóstico precoce através da realização de biopsias (exame histopatológico). Máculas, pápulas e placas são algumas das lesões encontradas, particularmente nas zonas do pescoço, nuca, parte superior das costas e tronco (fig. 3). Em afro-americanos as lesões sarcoides provocam despigmentação e cicatrizes[22, 23].

O lúpus pérmio é uma manifestação cutânea de sarcoidose que se caracteriza pelo aparecimento de púrpuras, infiltradas e endurecidas, surgindo preferencialmente nos lábios, nariz e orelhas (fig. 3). Embora raro, é frequente em mulheres afro-americanas e está associado a sarcoidose crônica e envolvimento extrapulmonar[23]. As lesões mantêm-se por períodos prolongados (a remissão espontânea é rara) e são difíceis de controlar farmacologicamente [22].



Figura 2. Exemplos de lesões cutâneas A: placas sarcoidóticas; **B** lesões características do lúpus pérmio. Adaptado de Iannuzzi 2007

Cerca de 10% dos doentes com sarcoidose apresenta eritema nodoso, que resulta de um quadro de inflamação dos adipócitos cutâneos (paniculite) e encontra-se associado a doença aguda e bom prognóstico [1, 14, 15].

1.3.4 Envolvimento Neurológico

Estudos realizados em autópsias indicam que 25% dos casos de sarcoidose com envolvimento neurológico são detetados *pós-mortem*[14]. Manifestações neurológicas ocorrem normalmente após 2 anos do diagnóstico inicial e

caracterizam-se por disestesias e dor periférica [24]. Surge por volta dos 33-40 anos e é mais comum afro-americanos e em mulheres (64%)[25]. As diferentes manifestações clínicas Do envolvimento neurológico na sarcoidose e o seu prognóstico estão descritas na Tabela 2 [24].

Geralmente os casos de neurosarcoidose estão associados a envolvimento da pele (30%), dos pulmões (88 a 94%) e dos olhos (37 a 55%) [17, 24] .

Tabela 2. Manifestações clínicas da neurosarcoidose e o seu prognóstico
(++++ bom prognóstico; + mau prognóstico). Adaptado de Nozaki 2012

		Prognóstico
Manifestações clínicas	Neuropatias cranianas:	
	- Nervo ótico	++
	- Nervo facial	++++
	Meningite aguda	++++
	Meningite crónica	++
	Convulsões	++
	Mielopatia	+
	Hidrocefalia	++
	Neuropatia periférica	+++
	Miopatia	+++

1.3.5 Envolvimento ocular

O comprometimento ocular ocorre em 25 a 80% dos doentes. As uveítes anteriores são a manifestação clínica mais comum, ocorrendo em 65% dos casos. Estas uveítes podem originar glaucomas e perda de visão. Uveítes do segmento posterior são reportadas em 30%. Visão turva, lacrimejar constante, fotofobia e olhos secos são sintomas frequentes quando existe envolvimento ocular[14, 26].

1.3.6 Envolvimento Cardíaco

O envolvimento cardíaco na sarcoidose é frequente na população japonesa (77%) [17], particularmente em mulheres com idade superior a 50 anos, e raro em populações europeias e americanas (5%). Manifesta-se por bloqueio atrio-ventricular, hiperexcitabilidade ventricular, taquicardia ventricular e morte súbita. **Granulomas sarcoidóticos são encontrados em 25% dos doentes examinados *post-mortem*.** [1, 14]

1.3.7 Fígado e pâncreas

Em cerca de 60% dos doentes o envolvimento hepático é assintomático, associado a função hepática normal ou ligeiramente alterada. É comum em afro-americanos e americanos de descendência europeia.

A sarcoidose pancreática é rara, com uma prevalência de 1 a 5% (registos médico-legais). A apresentação clínica manifesta-se por inflamação tecidual e/ou obstrução ductal, sendo necessário fazer diagnóstico diferencial com pancreatite ou cancro pancreático, dificultando o diagnóstico [14, 27].

1.3.8 Envolvimento Renal

O envolvimento renal na sarcoidose é detetado em 20% das autópsias. Resulta da presença de granulomas nos rins ou pela alteração do metabolismo do cálcio[28].

A hipercalciúria manifesta-se em cerca de 40-62% dos doentes no entanto, a sua patogénese na sarcoidose não está totalmente esclarecida. Pode provocar nefrocalcinose, nefrolitíase (10%) e raramente diabetes insipidus nefrogénico.

A hipercalcemia é a consequência menos comum (5-11%) nos doentes com sarcoidose. Pode ser transitória na forma subaguda ou tornar-se permanente na forma crónica. Manifesta-se por desidratação, poliúria, náuseas, dor abdominal, entre outras[28, 29].

1.4 Diagnóstico da sarcoidose

A sarcoidose é um diagnóstico de exclusão estabelecido de acordo com:

- Presença de granulomas não caseosos [estes não permitem estabelecer o diagnóstico definitivo pois são comuns em outras doenças como tuberculose, linfomas e tumores epiteliais (da mama e do pulmão)] [30-33];

- Exclusão de doenças específicas que possam apresentar quadro clínico semelhante, como por exemplo, tuberculose e beriliose, entre outras;
- Confirmação histopatológica, (frequente nos casos de Síndrome de Löfgren);
- Radiografia do tórax e lavado broncoalveolar (LBA). Tipicamente o LBA revela linfocitose, níveis de granulócitos normais e/ou baixos e aumento da razão $CD4^+/CD8^+$ [34]. Recentemente foi demonstrado que o padrão celular pode facilitar o diagnóstico diferencial visto que o aumento de mastócitos no LBA parece estar associado a um pior prognóstico[35, 36].

O envolvimento granulomatoso em pelo menos dois órgãos torna o diagnóstico mais preciso [19].

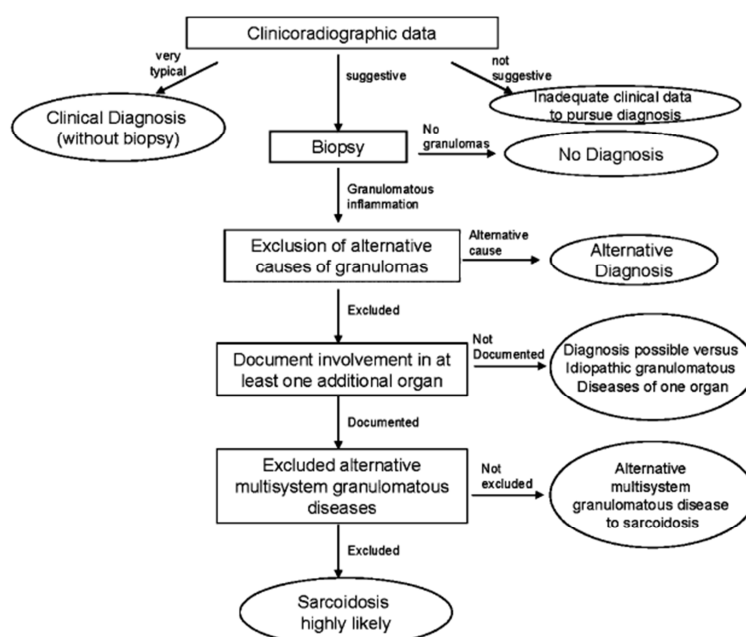


Figura 3. Esquema proposto para abordagem de diagnóstico na sarcoidose. Adaptado de Robert Baughman 2011

1.4.1 Exames complementares de diagnóstico (ECD)

- **Radiografia do tórax** (permite avaliar o comprometimento pulmonar e definir estádios radiográficos);
- **Broncoscopias** [permite obter tecido pulmonar para biopsia. A biopsia transbrônquica (BTB) diagnostica cerca de 40 a 90% dos casos, enquanto a biopsia aspirativa com agulha fina transbrônquica diagnostica 63 a 90% dos doentes com adenopatias hilares];
- **Pletismografia** que permitem avaliar a função pulmonar;

- **TAC** (Tomografia Computorizada Axonal)
- **TAC** por emissão de pósitrons (PET-CT), com flúorodeoxyglucose (F-FDG) ajuda a caracterizar a natureza sistêmica da sarcoidose, pois permite discriminar se as condensações pulmonares correspondem a inflamação ativa ou a fibrose. O recurso a este procedimento é de custo elevado e tem sido contestada a sua utilização como ECD [35, 37].
- **RMN** (Ressonância Magnética Nuclear), permite detetar lesões sarcoides em órgãos específicos, como o cérebro, músculo e ossos[38].
- **ECA** (Enzima Conversora de Angiotensina). Estudos indicam que esta enzima se encontra aumentada em 80% dos casos agudos e em 20% dos casos crónicos (no entanto este teste deve ser avaliado com outros parâmetros indicadores da doença).

1.5 Tratamento

O tratamento na sarcoidose permite modificar o processo granulomatoso e alterar a expressão clínica da doença. O mecanismo de ação dos fármacos é parcialmente conhecido, sendo que a maioria atua ao nível do TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) que desempenha um papel importante na iniciação e perpetuação da sarcoidose. Não existem protocolos que permitam definir qual o tratamento, nem quando deve ser iniciado. Cerca de 20 a 70% dos doentes requer terapia e a decisão de tratar estes doentes é definida por três fatores: risco de disfunção severa ou danos irreversíveis em órgãos vitais, risco de morte ou de sintomas constitucionais incapacitantes[17].

1.6 Fatores desencadeantes da sarcoidose

A causa da sarcoidose permanece desconhecida, no entanto estudos referem associações com microrganismos, metais, poeiras orgânicas e inorgânicas e auto antígenos. Atualmente a teoria mais aceite é que agentes ambientais infecciosos desencadeiam eventos imunológicos e inflamatórios, em pessoas geneticamente suscetíveis. A natureza heterogênea da doença sugere que possa ser causada por múltiplos agentes, resultando em diferentes padrões da doença [39].

1.6.1 Agentes infecciosos

1.6.1.1 *Mycobacterium*

O papel do *Mycobacterium* na etiologia da sarcoidose não está totalmente esclarecido. Hance (1998) e Richter (1999), através da análise a tecidos sarcoidóticos não encontraram evidências de DNA (Ácido desoxirribonucleico) micobacteriano[40]. Moller e colaboradores relatam a presença de péptidos micobacterianos em tecidos sarcoides. Estes investigadores descrevem que agregados micobacterianos podem induzir uma resposta imune T helper1 (Th1) associada a uma resposta patogénica humoral na sarcoidose [40].

1.6.1.2 *Propionibacterium acnes*

A bactéria comensal *Propionibacterium acnes*, que vive predominantemente na flora cutânea é outro organismo que tem sido implicado na etiologia da sarcoidose pela notável capacidade de induzir respostas inflamatórias granulomatosas em modelos experimentais e regular a expressão da MCP-1, uma citocina com um papel importante na formação de granulomas na tuberculose, sarcoidose e outras doenças granulomatosas[40]. Esta bactéria foi detetada em 78% de tecidos sarcoidóticos e foi também demonstrado que existe uma resposta de anticorpos em 40 % de amostras de tecidos sarcoidóticos através do LBA quando comparadas com 5% de indivíduos saudáveis. Tal como a controvérsia gerada pelo facto de que o *Mycobacterium* possa ser o causador da doença, o mesmo acontece com a *Propionibacterium*, isto porque é um organismo comensal que também pode ser encontrado nos intestinos, gânglios linfáticos e tecido pulmonar de indivíduos saudáveis [39, 40]

1.6.1.3 Vírus

A infeção viral tem sido proposta como fator desencadeante da sarcoidose, no entanto, uma importante limitação desta hipótese é o facto de não explicar a formação de granulomas epitelioides, típicos da doença. O EBV (Epstein-Barr Vírus) e outros vírus “herpes-like” têm sido associados à sarcoidose. Anticorpos séricos contra estes vírus tendem a ter um valor elevado em doentes com sarcoidose comparativamente a indivíduos saudáveis. Nagate e colaboradores demonstraram a existência de DNA do vírus (HHV) -6 (Human Herpes Virus) no LBA de doentes com sarcoidose, no entanto esta espécie também foi encontrada em indivíduos saudáveis [39, 40].

1.6.2 Fatores ambientais

Agentes ambientais têm sido associados à etiologia da sarcoidose. Esta hipótese é sustentada pela variação sazonal da doença e pela ocorrência em grupos profissionais ou isolados geograficamente [41]. Exposição a metais, poeiras, fumos e antígenos orgânicos podem causar doenças granulomatosas, difíceis de distinguir clinicamente da sarcoidose, o que revela a importância de uma pesquisa cuidadosa sobre exposições ambientais e ocupacionais quando se faz o perfil clínico dos doentes[42].

Um estudo realizado entre 1996 e 1999, **ACCESS** (“A Case Controlled Etiologic Study of Sarcoidosis”) nos EUA, explorou as características clínicas da doença, as diferentes etiologias ambientais e comparando casos e controles.[43-45].

Dos agentes ambientais positivamente associados à sarcoidose, destacam-se os inseticidas e pesticidas. Importantes associações negativas como a associação com o cigarro foram encontradas (fumadores ativos ou fumadores passivos). Componentes do cigarro parecem provocar uma redução da resposta imune das células-T nos pulmões, reduzindo a resposta antígeno-específica e promovendo resposta T helper 2 (Th2)[46].

Outras associações negativas foram encontradas com pelo de gato e penas. Estes agentes têm em comum o facto de estarem associadas a doenças alérgicas (resposta Th 2), sugerindo que agentes causadores de alergias possam diminuir o risco de desenvolver sarcoidose[45].

Tabela 3. Exposições ambientais e ocupacionais com ou sem associação à sarcoidose

Associações Positivas	Associações Negativas
Agricultores	Tabaco
Inseticidas (local trabalho)	Creches
Pesticidas (local trabalho)	Gatos
Bolor/Míldio	Poeiras de origem animal
	Penas
Sem associação	Indeterminadas
Pó de madeira	Bombeiros
Pólen de pinho	Militares
Metais	
Sílica ou talco	
Profissionais de saúde	

1.7 Imunopatogénese

A reação sarcoidótica envolve uma interação entre macrófagos e linfócitos T $CD4^+$. Os monócitos são recrutados do sangue para os tecidos, tornando-se macrófagos residentes (histiócitos) com a função de degradar o agente desencadante da sarcoidose. Acredita-se que este agente seja de degradação lenta, levando à formação de granulomas crônicos [16]. O antígeno responsável pelo recrutamento de macrófagos é processado e apresentado aos linfócitos T $CD4^+$ pelo complexo major de histocompatibilidade (MHC). Na persistência do estímulo antigénico, os histiócitos transformam-se em células epitelioides através da ação das citocinas libertadas pelos linfócitos T $CD4$ que infiltraram o local. As citocinas apresentam padrão T helper 1 (Th1), com produção de IL-2, INF- γ , TNF- α , IL-12, IL-15, IL-18, levando à formação do granuloma. No decorrer do processo granulomatoso pensa-se que existe uma mudança da resposta imune para o perfil de citocinas Th2, que favorecem a fibrogénese, da qual resulta fibrose pulmonar [14, 16, 39, 47, 48].

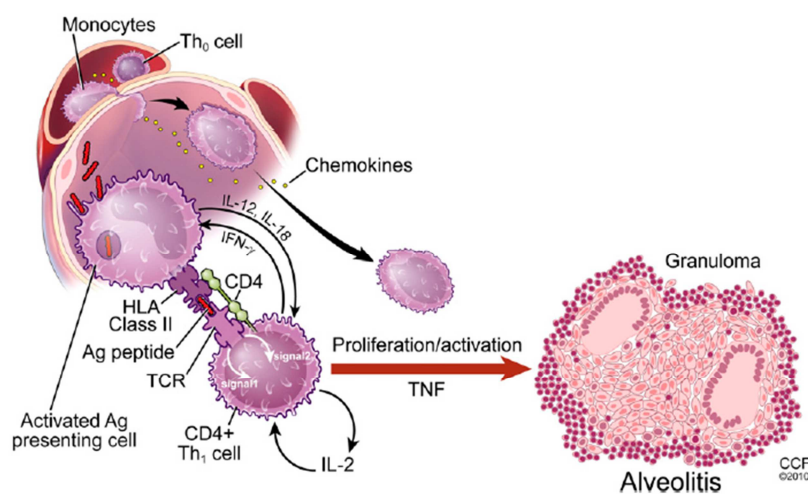


Figura 4. Resposta inflamatória na sarcoidose com formação de granuloma.

Adaptado de Baughman 2011

Os granulomas apresentam estrutura compacta e dinâmica, composta essencialmente por macrófagos jovens recrutados continuamente, circundados por linfócitos T $CD4^+$ e linfócitos B [16].

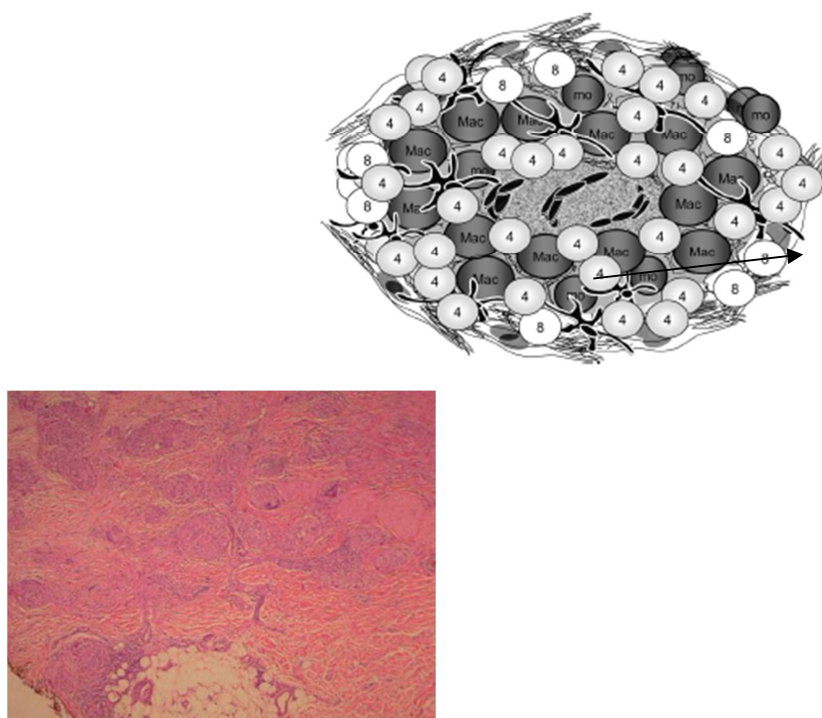


Figura 5. Constituição granuloma sarcoidótico. Adaptado de Aliya Noor, 2007 e de Daldon 2007

1.8 Sarcoidose e fatores genéticos

Vários fatores sugerem predisposição genética para a sarcoidose, como a incidência em aglomerados familiares, diferentes prevalências, tipo de apresentação clínica e grau de severidade, associados a diferentes etnias e regiões geográficas [44, 49]. A pesquisa de fatores genéticos que influenciam a suscetibilidade para a doença tem sido investigada em genes localizados em vários cromossomas. Uma das regiões mais explorada é a do MHC localizado no braço curto do cromossoma 6 (Fig. 7) [50, 51].

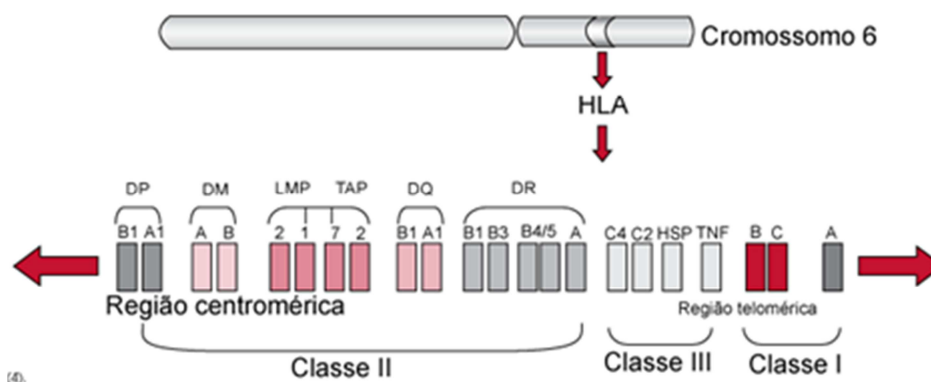


Figura 6. Cromossoma 6 e região do MHC

1.8.1 Sarcoidose e genes HLA (Human Leucocyte Antigen)

O MHC é a região cromossômica mais polimórfica do genoma humano e é fundamental para o desenvolvimento e funcionamento do sistema imune. Foi descoberto como resultado de estudos efetuados em ratinhos, conduzidos inicialmente por Peter Gorer, em 1932 e mais tarde por George Snell, em 1940. Estes investigadores concluíram que esta região cromossômica contém genes que influenciam a compatibilidade dos transplantes. Foi, então, possível observar através de cruzamentos entre ratinhos de estirpes diferentes a existência de um *locus major* que controla a rejeição de enxerto. O envolvimento destes *loci* no controlo da compatibilidade de tecidos levou a que este grupo de genes fosse designado como *locus* de histocompatibilidade (H). O *locus* dominante foi designado **Complexo Major de Histocompatibilidade**. Na década de 50, Jean Dausset observou a existência de aloantígenos em indivíduos politransfundidos. Foram realizados estudos genéticos, serológicos e moleculares a esses aloantígenos, que permitiram a identificação e caracterização dos produtos génicos do MHC, localizados na superfície de leucócitos, razão pela qual as moléculas MHC humanas são designadas de **HLA**. Estes estudos levaram a que George Snell e Jean Dausset, juntamente com Baruj Benacerraf, recebessem o prémio Nobel em Fisiologia e Medicina.

No Homem, o MHC está localizado no braço curto do cromossoma 6 na região 6p21.3, enquanto nos ratinhos se localiza no cromossoma 17[52]. No Homem, o complexo abrange 4,6Mb contém mais de 1000 genes, pseudogenes e fragmentos génicos

Esta região do genoma humano foi subdividida em três regiões, classe I, II e III, de acordo com a estrutura e função dos produtos génicos (Fig. 5). O MHC existe em todos vertebrados com uma organização cromossômica semelhante apesar de localizado em cromossomas diferentes.

As primeiras descrições da associação HLA-Sarcoidose, ocorreram em 1973, quando Hedfors e Moller demonstraram associação com o antígeno HLA-B7 num grupo de 50 doentes[53].

Grunewald e colaboradores demonstraram que os alelos HLA-A*02, B*07 e B*08 encontram-se associados a doença persistente[54]. Estes resultados também foram encontrados por Morais e colaboradores, numa população portuguesa, embora estatisticamente sem significado [51]. Atualmente sabe-se que alelos HLA- classe II têm um papel dominante na determinação do risco e do fenótipo apresentado pela doença [55-57]. A importância da caracterização fenotípica dos doentes na determinação de marcadores genéticos na sarcoidose, tem sido referida por vários investigadores. Numa população de doentes suecos, Grunewald, reportou que os alelos DRB1*03 e DRB1*14, são fatores de risco enquanto os alelos DRB1*01 e DRB1*04 encontram-se constantemente associados a proteção, na comparação entre população controlo e doentes. Quando compararam doentes Lofgren e não-Lofgren, verificaram que o alelo HLA-DRB1*03 influenciava a severidade da doença nos doentes Lofgren e que os alelos DRB1*07, DRB1*14 e DRB1*15 estavam relacionados com doença não resolvida. Estes resultados demonstram a importância da estratificação e caracterização fenotípica, de uma população em estudos de associação[58].

Um estudo realizado por Voorter e colaboradores, demonstrou uma associação fortemente positiva entre o haplótipo DQB1*0602/DRB1*1501 e a sarcoidose numa população holandesa de descendência europeia. Quando compararam subgrupos de doentes, verificaram que esta associação era mais forte em doentes com pior prognóstico[59].

Rybicki e colaboradores, demonstraram que genes DQB1 são mais importantes para a suscetibilidade na sarcoidose em indivíduos Afro-Americanos [60]. Estudos mais recentes reportaram que os alelos DRB1*15 e DRB1*14 estão significativamente associados a sarcoidose crónica em doentes escandinavos e os alelos B*07, DRB1*15 e DQB1*0602 conferem maior risco para sarcoidose persistente [54, 61]. DQB1*0602 DRB1*15, foram relacionados com o risco em doentes polacos e do reino unido[62].

Um importante estudo realizado por Sato, em grupos étnicos distintos (Reino Unido, Holanda e Japão), demonstrou diferenças nas frequências dos fenótipos de sarcoidose, no entanto, subtipos clínicos apresentavam associações HLA semelhantes independentemente da etnia. Verificaram que o alelo HLA-DRB1*01 e DQB1*0501 são protetores, contra todas as manifestações clínicas de sarcoidose. Sarcoidose com predomínio pulmonar foi associada aos alelos DRB1*12 e DRB1*14. O alelo DRB1*03 foi associado a Síndrome de Lofgren, apenas em doentes holandeses e proteção em

doentes britânicos; é pouco frequente na população japonesa. O haplótipo DRB1*04-DQB1*0301 foi descrito como fator de risco em doentes japoneses e britânicos [63].

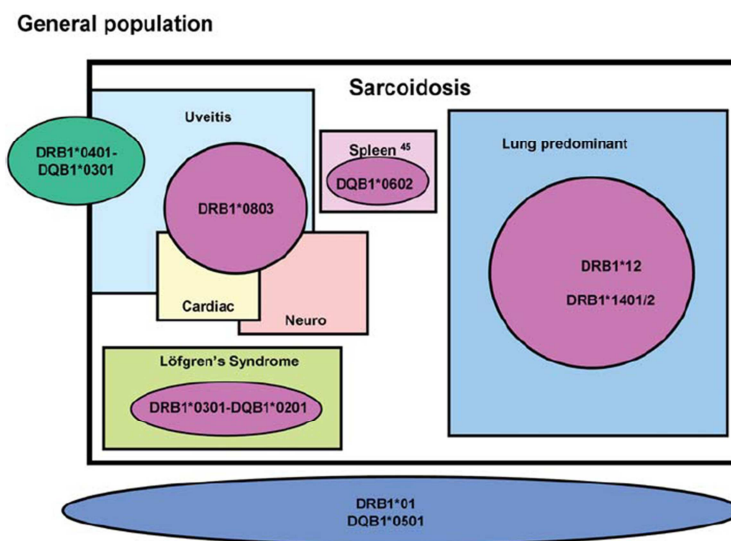


Figura 7. Associação DRB1 e envolvimento sistêmico. Adaptado de Sato, 2010

1.8.2 Sarcoidose e genes não-HLA

Vários investigadores referem que devido ao forte desequilíbrio de ligação da região MHC, os alelos HLA podem não determinar diretamente a suscetibilidade à doença, e que as associações descritas são devidas a outros genes presentes na mesma região (genes não-HLA). O gene *Butyrophilin like 2* (BTNL2), que se encontra localizado na junção das regiões classe II e classe III do HLA, é um gene candidato e parece estar associado à suscetibilidade à sarcoidose[64, 65].

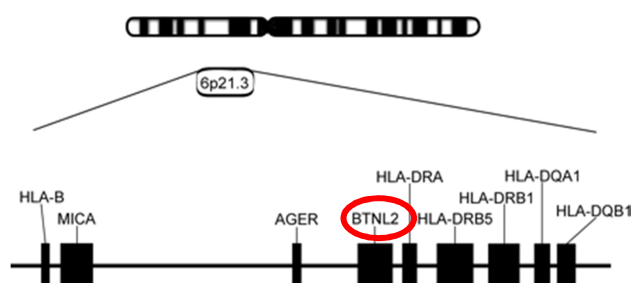


Figura 8. Localização do gene BTNL2 no cromossoma 6

É membro das moléculas *Butyrophilin-like* (BTNLs) e apresenta homologia com as moléculas CD80/CD86 (família B7), expressas à superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs), fundamentais na resposta imune[65]. Em células humanas o gene BTNL2, juntamente com células epiteliais da mucosa, é expresso em células dendríticas (baço e gânglios linfáticos)[66] e células B (periféricas), consistente com o papel na modelação da função das APCs. Tem sido demonstrado que este gene inibe a proliferação das células T e a produção de IL-2[67].

Polimorfismo rs2076530 do gene BTNL2

Vários polimorfismos do gene BTNL2 têm sido estudados numa tentativa de determinar o risco e o fenótipo apresentado pela doença. Valentonyte e colaboradores, demonstraram numa população alemã, uma associação do alelo A do polimorfismo rs2076530 com um aumento da suscetibilidade para a sarcoidose[64], independentemente dos alelos HLA[64].

Rybicki e colaboradores, estudaram o mesmo polimorfismo, em doentes americanos de descendência europeia e em afro-americanos. Verificaram que este SNP estava fortemente associado aos americanos[68].

Valentonyte e Rybicki compararam apenas doentes e população controlo, não estratificando os doentes de acordo com a Síndrome de Lofgren, uma forma aguda geneticamente e fenotipicamente importante.

Milmen e colaboradores, descrevem o aumento do alelo A e do genótipo AA, numa população dinamarquesa (o desequilíbrio de ligação com o locus DRB1 e DQB1, não foi considerado)[69]. Spagnolo em populações do Reino Unido e da Dinamarca, também descreveram uma associação com o rs2076530 (comparação doentes vs população controlo), no entanto esta associação não foi encontrada quando excluía doentes com Síndrome de Lofgren, sugerindo que estes resultados são devidos ao desequilíbrio de ligação com alelos HLA-Classe II.

Morais, numa população portuguesa, descreve associação do polimorfismo rs2076530 em doentes Lofgren e com o alelo HLA-DRB1*03[70]. A associação do alelo DRB1*03 e Síndrome de Lofgren está bem documentada em várias populações.

1.9 Sarcoidose e implicação médico-legal

A taxa de mortalidade na sarcoidose situa-se nos 5%. A morte acontece maioritariamente por fibrose pulmonar, no entanto morte súbita, falha renal, entre

outras, podem ser causa de morte primária. O envolvimento extratorácico é detetado em cerca de 20 a 30% em autópsias, o que levanta questões pertinentes relativas à:

- Importância de se efetuar um exame cadavérico detalhado e preciso, com recolha de tecido cerebral, renal, hepático e cardíaco, para exames histopatológicos de forma a identificar a causa primária de morte;
- Importância de um relatório bem estruturado e detalhado que permita recolher dados sobre a verdadeira prevalência da doença.

Como referido anteriormente a prevalência/incidência da doença pode ser estimada através de registos médico-legais.

Em 1999 a American Toracic Society (ATS), identificou algumas doenças cuja etiologia poderia estar associada a agentes ambientais e ocupacionais. A sarcoidose foi positivamente associada ao uso de pesticidas e inseticidas, no local de trabalho[42]. Neste contexto, a exposição do doente a determinados agentes desencadeantes é sempre questionada pelo médico devido às possíveis limitações daí decorrentes para o paciente, na sua vida pessoal e profissional, dado que o contacto permanente com qualquer agente causal deve ser evitado.

Como referido anteriormente o espectro de manifestações clínicas da sarcoidose é variável, assemelhando-se a outras patologias granulomatosas. Assim sendo, quando o quadro clínico não é esclarecedor, a genotipagem pode ser um importante auxiliar de diagnóstico pois parecem existir marcadores genéticos fortemente associados à doença. Estes podem também ser úteis, para determinar a gravidade da doença e traçar um perfil de tratamento e acompanhamento muito mais seguro. Sabe-se que 70% dos doentes resolvem a doença (com ou sem terapêutica), no entanto, existem casos crónicos em que o doente desenvolve limitações que podem afetar a sua vida pessoal e profissional. Neste âmbito a legislação portuguesa, (Tabela Nacional de Incapacidades, decreto-Lei nº 352/2007, de 23 de Outubro), permite a atribuição de incapacidade pelas limitações decorrentes de doenças profissionais. As limitações provocadas pela sarcoidose podem ser abrangidas:

Anexo 1 (incapacidades temporárias):

- Capítulo II (Dismorfias) – alterações morfológicas ou outras com repercussão funcional e/ou estética;
- Capítulo III (Neurologia e neurocirurgia) – crânio e sistema nervoso central;

- Capítulo IV (Oftalmologia);
- Capítulo VI (Angiocardiologia) – Doenças vasculares;
- Capítulo VII (Pneumologia)

Anexo 2 (incapacidades permanentes):

- Capítulo I (sistema nervoso e psiquiatria);
- Capítulo IV (sistema cardiorrespiratório);
- Capítulo X (Sistema cutâneo).

Um aspeto importante da doença e que tem sido subvalorizado é o caso das depressões (também contempladas na Tabela Nacional de Incapacidades) isto porque, 60% dos doentes com sarcoidose manifesta síndrome depressivo [71].

OBJETIVOS

II. OBJECTIVOS

A sarcoidose, é uma doença que pode permanecer assintomática e de resolução fácil mas também pode provocar sintomas variados dificultando o seu diagnóstico. A formação de granulomas em órgãos vitais como os pulmões, coração ou cérebro constitui a manifestação clínica que melhor caracteriza a doença.

Objetivos gerais:

- Aprofundar os conhecimentos sobre a patologia em questão, tanto na sua componente clínica como genética e, fundamentalmente, compreender de que forma marcadores genéticos têm influência na susceptibilidade à sarcoidose

Objetivos específicos:

- Qual o contributo da identificação dos alelos do *locus* HLA-DRB1 e do polimorfismo rs2076530, na decisão da atribuição de incapacidade por doença profissional?
- Qual o contributo desses polimorfismos para o risco de desenvolver sarcoidose?
- Estão estes genes implicados na apresentação clínica e curso da doença?

MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População em estudo

No presente trabalho, foram investigados 106 doentes com sarcoidose, provenientes da região norte do país. Os doentes foram recrutados prospectivamente da consulta externa da Unidade de Pneumologia do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia e Espinho e do Hospital de São João. Desta coorte de doentes, foram recolhidos dados clínicos e algumas informações demográficas, nomeadamente, idade e sexo. A população controlo, era constituída por 282 indivíduos para análise genética dos alelos HLA-classe II. Para determinação das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2076530 a população controlo era constituída por 118 indivíduos. Ambos os grupos controlo eram constituídos por indivíduos saudáveis sem patologia conhecida.

3.1.1 Caracterização clínica

O diagnóstico clínico de sarcoidose foi estabelecido a partir de achados anormais na radiografia do tórax e de exames histopatológicos.

A coorte de doentes foi dividida em 2 grupos: (a) **doentes Lofgren**; (b) **doentes não-Lofgren**.

3.2 Amostras biológicas

Amostras biológicas de sangue periférico foram colhidas de indivíduos com diagnóstico de sarcoidose e população controlo, por punção venosa, para tubos de colheita, já preparados com um anti-coagulante – EDTA.

3.4 Estudos genéticos

3.4.1 Estudos de associação

Nos estudos de associação comparam-se dois grupos distintos (doentes *versus* controlos; doentes com Síndrome de Lofgren *versus* doentes não-Lofgren) com o objetivo de avaliar se determinadas variantes genéticas são mais frequentes num determinado grupo. Presume-se que os alelos que predisõem à doença sejam mais frequentes em doentes, quando comparados com a população controlo, da mesma maneira que os alelos que possam oferecer proteção contra o desenvolvimento da doença sejam mais frequentes em indivíduos controlos.

SNP rs2076530 do gene da BTNL2

Polimorfismos genéticos são variações na sequência da molécula de DNA. A variação genética mais frequente que ocorre no genoma humano é denominada de Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Estas variações são caracterizadas pela alteração de um único nucleótido e podem ocorrer em qualquer região do genoma.

Ao pretendermos neste trabalho avaliar o envolvimento de genes na sarcoidose, selecionamos após revisão da literatura, o SNP rs2076530 do gene da BTNL2.

3.5 Extração de DNA: método ‘salting-out’

O DNA genómico foi isolado de leucócitos de sangue periférico, utilizando uma modificação do método clássico de “Salting Out”, descrito por (Miller e colaboradores, 1988). Este método, baseado na baixa solubilidade das proteínas na presença de elevadas concentrações de sais, permite a extração de um grande quantidade de DNA, revelando-se uma importante vantagem sempre que se pretende armazenar e conservar o DNA.

Numa 1ª fase isolaram-se as células mononucleares (leucócitos), centrifugando as amostras de sangue a 2000rpm, durante 10 minutos. Após centrifugação, obteve-se uma fase celular (eritrócitos e buffy coat – anel leucócitos) e uma fase líquida (soro). Retirou-se o plasma e o buffy coat (com alguns eritrócitos à mistura) para um tubo Falcon de 50mL, ao qual se adicionou 50mL de tampão de lise de eritrócitos (RCLB)

homogeneizou-se e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente procedeu-se a uma centrifugação a 2000rpm, durante 10 minutos a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante (glóbulos vermelhos e outros componentes celulares) e o *pellet* de leucócitos foi submetido a novas lavagens com RCLB e consecutivas centrifugações (com os mesmos parâmetros), até se obter um *pellet* completamente branco. Na fase seguinte adicionou-se ao *pellet* 3,5mL de tampão TE-2 (Tris-EDTA), 200µL de SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) e 10µL da enzima Proteinase K. O SDS é um detergente que activa a enzima e, juntamente com o TE-2, promove a lise membranar, possibilitando assim a libertação de DNA e das proteínas intracelulares.

Após agitação no vórtex, a amostra foi incubada 24 horas a 42°C, possibilitando a ação digestora da enzima sobre as células lisadas. Um vez digerida, a amostra foi transferida para um tubo cónico de 15mL e ao qual se adicionou 1mL de NaCl (Cloreto de sódio) 6M. Este tampão salino precipita as proteínas, rebentando as membranas dos leucócitos e libertando desta forma o DNA para o meio. Depois de agitada no vórtex, a solução foi submetida a agitação lenta num agitador magnético durante 10 minutos, até que a mistura apresentasse um aspeto leitoso resultante da precipitação das proteínas. Seguidamente procedeu-se a uma centrifugação a 3000rpm, durante 30 minutos a 23°C, permitindo separar o sobrenadante que continha o DNA, do precipitado de proteínas. Assim, transferindo-se o sobrenadante para um Falcon de 15mL e desprezando-se o conteúdo proteico, promoveu-se finalmente a precipitação de DNA adicionando ao tubo 20mL de etanol absoluto frio (-20°C). O Etanol desidrata a molécula de DNA obrigando-a a sair da solução possibilitando assim e após inversão repetida do tubo, a formação de um novelo de DNA. Depois de lavado com 5mL de etanol frio a 70°C, o novelo de DNA é ressuscitado em tampão TE buffer num *eppendorf* de 1,5mL. A quantidade de TE utilizada para ressuscitar o DNA foi determinada pela observação empírica do tamanho do novelo. Numa etapa final, deixou-se o DNA durante algumas horas num agitador rotativo para que pudesse entrar em solução.

3.6 Isolamento e quantificação do DNA

Tal como mencionado e descrito anteriormente, a extração do DNA foi feita através do método “salting-out”, ao qual se seguiu a sua quantificação espectrofotométrica, utilizando um Nanodrop. Uma vez verificado o grau de pureza (A260/A280) e as concentrações de DNA, e visto que, devido à sensibilidade do

método, a reação de amplificação necessita apenas de 2 a 10ng de DNA, foram feitas diluições com volume final de 200µL e concentração final de 2,5ng/µL.

3.7 Amplificação do DNA para genotipagem dos alelos HLA-DRB1

Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A PCR foi introduzida por Mullis *et al.* (1986) e consiste na amplificação enzimática de um fragmento de DNA, de forma exponencial, simulando o processo de replicação que ocorre *in vivo*. Esta reação é caracterizada por um conjunto de ciclos que compreendem 3 fases distintas:

- **Desnaturação do DNA genómico** – a mistura de reação é aquecida até atingir a temperatura de aproximadamente 94-96 °C. Esta temperatura provoca a desnaturação da cadeia dupla de DNA passando a existir em solução DNA de cadeias simples.
- **Emparelhamento dos primers (*Annealing*)** – a temperatura diminui até 30-70°C dependendo da constituição dos *primers*. Esta temperatura é ideal para a hibridação/emparelhamento dos *primers* com uma sequência complementar do DNA genómico a amplificar.
- **Extensão da cadeia de DNA pela enzima *Taq* polimerase** – a temperatura sobe de novo até aos 72 °C, temperatura ótima para a atuação da *Taq* polimerase. A enzima começa a extensão da cadeia complementar adicionando os respetivos desoxinucleótidos trifosfatados [dNTP's: adenina (dATP), timina (dTTP), guanina (dGTP) e citosina (dCTP)].

O método utilizado para a tipagem do HLA-DRB1 designa-se por PCR-SSP (*Sequence Specific Primers*). A metodologia de PCR-SSP, baseia-se no princípio de que *primers* de oligonucleótidos com correspondência completa discriminam vários alelos ou grupo de alelos durante o processo de PCR e como tal os *primers* são utilizados de forma mais eficaz. Foram utilizadas misturas de *primers* (Thermo Scientific) previamente descritas no *XII workshop*. [72] Os pares de *primers* são concebidos para apresentar apenas correspondências perfeitas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de *primers*

com correspondência perfeita traduzem-se na amplificação de sequências alvo (ou seja, um resultado positivo), enquanto pares de *primers* sem correspondência não traduzem qualquer amplificação (ou seja, um resultado negativo).

As condições de PCR usadas para amplificação do *locus* HLA-DRB1 estão descritas na Tabela 3.

Tabela 4. Condições de amplificação do *locus* HLA-DRB1.

Mastermix	Concentração final
Tampão	1,0 x
dNTP's mix	200 μ M
Primers Controlo	0.75 μ M
Primers Específicos	0.5 μ M
Taq	0.2U/ μ L
MgCl₂	2,00mM
ddH₂O	-
DNA	25ng/ μ l

Ao produto amplificado adicionou-se 1 μ L de *Loading Buffer* (10x). Esta mistura foi sujeita a uma eletroforese horizontal num gel de agarose (*Seaken LE Cambrex*) a 1,5 % (p/v). O gel foi mergulhado no tampão TAE 1X (Trizma base, EDTA.Na₂ (*Sigma*) e ácido acético glacial) numa tina de eletroforese.

3.8 PCR em tempo real para amplificação do polimorfismo rs2076530

A PCR em tempo real é uma metodologia que permite a monitorização dos produtos de amplificação génica em todas as fases de uma reação de PCR. Durante a PCR em tempo real, a acumulação de produto de PCR é detetada em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas específicas ou *primers* usados na reação.

A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação. Das principais vantagens desta técnica, pode salientar-se não só a monitorização em tempo real e a rapidez do processo como uma elevada

sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade muitas vezes ausente na PCR convencional.

Para a amplificação do SNP de interesse foram usadas sondas Simpleprobe (sondas de hibridação), que se baseiam no princípio das curvas “melting” (fusão). Nesta metodologia é necessária apenas uma sonda, que hibrida especificamente com a sequência alvo que contém o SNP de interesse. Uma vez hibridados, a Simpleprobe emite um sinal de fluorescência maior do que quando não está hibridado com o seu alvo. Assim, as alterações de fluorescência dependem exclusivamente do estado de hibridação (Fig. 10).

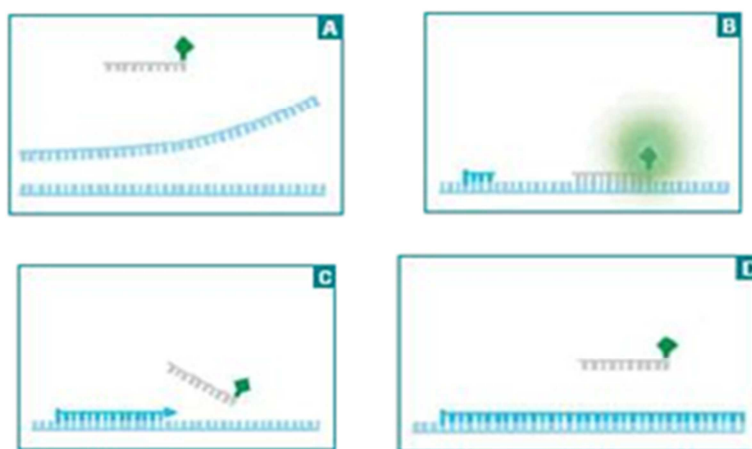


Figura 9. Representação esquemática da detecção pela simpleprobe A) Durante a fase de desnaturação não ocorre hibridação, apenas uma baixa fluorescência é detetada a 530nm; B) Durante a fase de emparelhamento a sonda hibrida com o fragmento de DNA e a fluoresceína quando excitada emite uma luz verde; C) durante a fase de extensão a Simpleprobe é libertada; D) no final da etapa de extensão gera-se cadeia dupla de DNA

Quando um indivíduo é homozigótico para um dos alelos, só se verifica aumento de um dos fluoróforos e quando o indivíduo é heterozigótico verifica-se o aumento de dois fluoróforos (Fig.11).

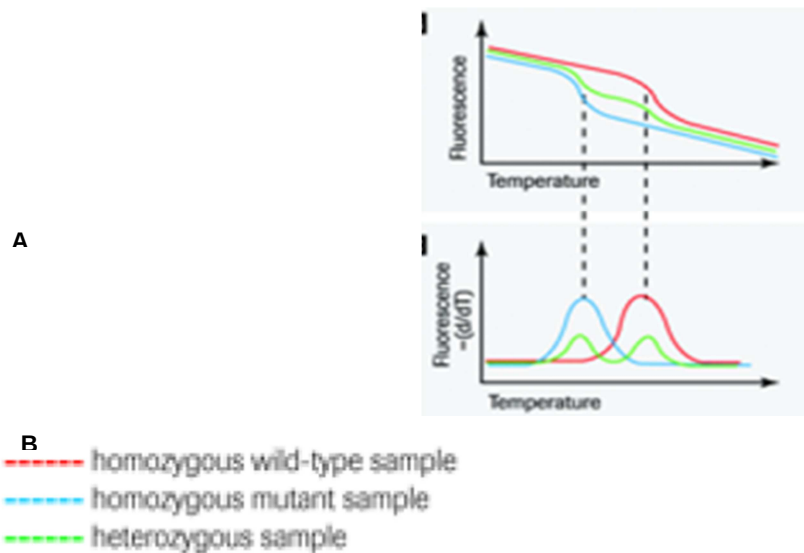


Figura 10. A: Curvas melting; B: Picos de melting

3.9 Análise estatística

As frequências alélicas dos loci estudados no grupo de doentes e no grupo controlo foram estimados por contagem direta e comparadas através de procedimentos estatísticos adequados. A Odds ratio constitui uma aproximação ao Risco Relativo (RR) frequentemente referido na literatura. Foram ainda analisadas as possíveis associações entre genotipagem de cada indivíduo e características como o sexo, forma clínica de doença e gravidade. De acordo com os pressupostos necessários serão realizados testes de análise estatística (teste de χ^2 , teste de Fisher). Na análise estatística dos dados foi utilizado o programa SPSS versão 20.0 (SPSS, Chicago Illinois, USA).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1 Características dos doentes

A população dos 106 doentes apresentava as características clínicas descritas na tabela 5.

Tabela 5. Características fenotípicas da população de doentes

	Doentes com sarcoidose (n=106)	Doentes Síndrome de Lofgren (n=20)	Doentes não-Lofgren (n=86)
Homens	42	6	32
Mulheres	64	14	48
Idade (média)	50.88	47.10	51.79

4.2 Identificação dos alelos do *locus* HLA-DRB1

4.2.1 Doentes *versus* (vs) População controlo

Foram analisadas as frequências dos alelos DRB1 entre doentes e população controlo

Tabela 6. Frequência alélica do *locus* DRB1 doentes vs população controlo

População Controlo (n=282)				Doentes (n=106)		OR	95% CI	p
DRB1	n	%		n	%			
DRB1*01	66	23		11	10	0,38	0,192-0,750	0,004
DRB1*03	44	16		24	23	1,58	0,907-2,764	0,104
DRB1*04	69	24		21	20	0,76	0,440-1,321	0,333
DRB1*07	72	26		24	23	0,85	0,504-1,447	0,557
DRB1*08	24	9		8	8	0,88	0,381-2,019	0,759
DRB1*09	14	5		4	4	0,75	0,241-2,224	0,619
DRB1*10	11	4		2	2	0,47	0,103-2,174	0,326
DRB1*11	55	20		22	21	1,08	0,621-1,881	0,783
DRB1*12	9	3		7	7	2,14	0,778-5,913	0,132
DRB1*13	84	30		32	30	1,02	0,626-1,659	0,939
DRB1*14	17	6		5	5	0,77	0,277-2,147	0,619
DRB1*15	56	20		24	23	1,18	0,688-2,029	0,546
DRB1*16	13	5		3	3	0,60	0,168-2,159	0,432

A frequência alélica do locus DRB1, permitiu observar que o alelo HLA-DRB1*01 estava significativamente diminuído na população de doentes quando comparado com a população controlo (10% vs 23%, **OR**=0.379, **CI**=0.192-0.750, **p**=0.004).

4.2.2 Doentes com Síndrome de Lofgren vs não-Lofgren

Com base no fenótipo da doença, consideraram-se dois grupos: doentes com Síndrome de Lofgren e doentes não-Lofgren.

Tabela 7. Frequência alélica do *locus* DRB1 em doentes com Síndrome de Lofgren vs doentes não-Lofgren

Doentes Lofgren (n=20)			Doentes Não- Lofgren (n=86)		OR	95% CI	p	
DRB1		n	%	n	%			
DRB1*01		5	25	6	7	0,23	0,061-0,833	0,017
DRB1*03		7	35	17	20	0,46	0,158-1,322	0,143
DRB1*04		1	5	20	23	5,76	0,725-45,729	0,065
DRB1*07		2	10	22	26	3,09	0,664-14,418	0,134
DRB1*08		1	5	7	8	1,68	0,195-14,516	0,632
DRB1*09		0	0	4	5	0,00	1,001-1,099	0,326
DRB1*10		0	0	2	2	0,00	0,991-1,058	0,491
DRB1*11		4	20	18	21	1,06	0,315-3,560	0,926
DRB1*12		0	0	6	7	0,00	1,015-1,139	0,224
DRB1*13		9	45	23	27	0,45	0,164-1,215	0,109
DRB1*14		2	10	3	3	0,33	0,051-2,090	0,216
DRB1*15		4	20	20	23	1,21	0,363-4,042	0,754
DRB1*16		0	0	3	3	0,00	0,995-1,079	0,397

Quando comparamos doentes com Síndrome de Lofgren vs doentes não-Lofgren, verificamos que a frequência do alelo HLA-DRB1*01 estava significativamente diminuído nos doentes não-Lofgren (7% vs 25%, **OR**=0.225, **CI**=0.061-0.833, **p**=0.017).

4.2.3 Doentes Lofgren vs população controlo

Tabela 8. Frequências alélicas do *locus* DRB1 em doentes Lofgren e população controlo.

População Controlo (n=282)			Doentes Lofgren (n=20)		OR	95% CI	p
DRB1	n	%	n	%			
DRB1*01	66	23	5	25	1,09	0,382-3,114	1,000
DRB1*03	44	16	7	35	2,91	1,100-7,710	0,025
DRB1*04	69	24	1	5	0,16	0,021-1,236	0,046
DRB1*07	72	26	2	10	0,32	0,073-4,412	0,119
DRB1*08	24	9	1	5	0,57	0,073-4,412	0,582
DRB1*09	14	5	0	0	0,00	0,929-0,979	0,308
DRB1*10	11	4	0	0	0,00	0,939-0,984	0,368
DRB1*11	55	20	4	20	1,03	0,332-3,209	0,957
DRB1*12	9	3	0	0	0,00	0,948-0,989	0,417
DRB1*13	84	30	9	45	1,93	0,771-4,826	0,154
DRB1*14	17	6	2	10	1,73	0,371-8,087	0,480
DRB1*15	56	20	4	20	1,01	0,325-3,136	0,988
DRB1*16	13	5	0	0	0,00	0,947-0,989	0,326

A comparação entre Síndrome de Lofgren vs população controlo demonstrou que a frequência do alelo HLA-DRB1*03 estava significativamente aumentado nestes doentes (35% vs 16%, **OR**=2.913, **CI**=1.100-7.710, **p**=0.025) e a frequência do alelo HLA-DRB1*04 encontrava-se diminuído no mesmo grupo (5% vs 24%, **OR**=0,162, **CI**=0,021-1,236, **p**=0,046).

4.3 Tipagem do polimorfismo rs2073065 do gene da BTNL2

4.3.1 Associação entre doentes vs população controlo

Recentes publicações evidenciam o importante papel na suscetibilidade para a doença do gene BTNL2 e em particular o polimorfismo rs2073065.

Tabela 9. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2076530 do gene da BTNL2 entre doentes e população controlo.

		População controlo (n=118)		Doentes (n=106)		OR	CI	p
rs2076530	Genotípica	n	%	n	%			
	AA	35	30%	31	29%	0,9802	0,551-1,743	0,9457
	AG	64	54%	55	52%	0,9099	0,319-2,812	0,7249
	GG	19	16%	20	19%	1,2118	0,089-2,546	0,5857
	Alélica							
	A	134	56%	117	55%	0,9375	0,645-1,302	0,735
	G	102	43%	95	45%	1,0667	0,734-1,550	0,735

As frequências genotípicas e alélicas do SNP rs2076530 entre doentes e população controlo não demonstraram associações estatisticamente significativas.

4.3.2 Associação entre doentes não-Lofgren e doentes Lofgren

Numa tentativa de percebermos se o polimorfismo rs2076530 tinha influência no fenótipo apresentado pela doença comparou-se doentes não- Lofgren e doentes com síndrome de Lofgren.

Tabela 10. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs2076530 do gene da BTNL2 entre doentes não-Lofgren e doentes Lofgren

		Doentes não- Lofgren (n=86)		Doentes Lofgren (n=20)		OR	CI	<i>p</i>
rs2076530	Genotípica	n	%	n	%			
	AA	25	29%	6	30%	1,0457	0,551-	0,9457
	AG	43	50%	12	60%	1,5000	0,319-2,812	0,7249
	GG	18	21%	2	10%	0,4198	0,089-2,546	0,5857
	Alélica							
	A	93	54%	24	11%	1,2742	0,645-1,302	0,735
	G	79	46%	16	8%	0,7848	0,734-1,550	0,735

Da comparação entre doentes não-Lofgren e doentes com Síndrome de Lofgren, não foram observadas associações estatisticamente significativas.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

A sarcoidose é uma doença de etiologia desconhecida. A presença em aglomerados familiares e as diferenças na incidência entre grupos étnicos sugere a existência de uma componente genética.

Apesar da associação do complexo HLA com a sarcoidose se reportar aos anos setenta, ainda hoje é controverso o envolvimento deste locus na sua patogénese. A literatura refere algumas associações entre alelos da classe I e a suscetibilidade à sarcoidose, nomeadamente a associação do alelo HLA-B*08 (em indivíduos de descendência europeia) com doença aguda de curta duração e regressão espontânea[73] e do alelo HLA-B*07 em doentes afro-americanos[74]. De acordo com alguns autores as associações observadas com genes HLA-classe I são devidas ao desequilíbrio de ligação com genes da classe II[75]. Recentes pesquisas evidenciam a importância de genes HLA-classe II, pelo papel que parecem desempenhar na fisiopatologia da doença. A associação com a suscetibilidade à sarcoidose foi descrita inicialmente com os antígenos HLA-DR2, DR5, DR6, DR8, DR9. Com o advento da identificação do HLA por biologia molecular foram reportadas várias associações com os alelos DRB1*03, DRB1*08, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*14 e DRB1*15[51].

Neste trabalho, pretendeu-se esclarecer o papel do *locus* DRB1 no contexto da heterogeneidade clínica da sarcoidose. Verificamos que a frequência do alelo DRB1*01 estava diminuída em doentes quando comparados a população controlo. Este resultado confirma o papel protetor, anteriormente reportado em populações do reino unido, polónia e república checa. Este alelo também tem sido descrito como protetor na esclerose múltipla e outras doenças inflamatórias e está relacionado com formas menos severas na artrite reumatoide[58].

De acordo com Grunewald, os resultados nos diversos estudos são condicionados pela correta estratificação dos doentes. Neste contexto foram definidos dois grupos: doentes com Síndrome de Lofgren e doentes não-Lofgren, de forma a correlacionar o fenótipo com a severidade da doença. Os resultados obtidos permitiram-nos já em 2012 (ver anexo) reportar pela primeira vez uma associação estatisticamente significativa entre o alelo DRB1*01 e Síndrome de Lofgren, sugerindo que este alelo possa ser marcador de bom prognóstico. Esta associação também tinha sido sugerida por Grunewald em 2011, no entanto, os resultados não tiveram significado estatístico[58].

A associação do alelo DRB1*03, reportada por Grunewald, e na qual ele compara doentes Lofgren vs doentes não-Lofgren não foi confirmada no nosso estudo[58]. No entanto, observamos essa mesma associação (HLA-DRB1*03) quando

comparamos doentes Lofgren vs população controlo. No nosso entender, este resultado também justifica a observação referida por este autor, isto é, este alelo pode ser marcador de bom prognóstico. Quanto aos doentes não-Lofgren salientamos que os nossos resultados são sobreponíveis aos obtidos por Grunewald, ou seja, não encontramos associação com o alelo DRB1*03[58]. De assinalar que este alelo é frequente em doentes de descendência europeia e raro em populações japonesas. Este fato pode ser a razão para os resultados inconsistentes reportados em diferentes grupos étnicos[76].

Neste estudo, e tal como no estudo referido anteriormente, o alelo HLA-DRB1*04 encontra-se diminuído nos doentes com Síndrome de Lofgren comparativamente à população controlo sugerindo proteção[58]. Esta associação também foi descrita para populações de doentes do Reino-Unido, Japão e Itália [58].

Com base nos resultados obtidos neste estudo, a tipagem HLA pode ser uma ferramenta útil para prever a evolução da sarcoidose, reflectindo-se no seu acompanhamento e tratamento.

Nos últimos anos têm surgido novas associações de genes não-HLA com a sarcoidose, com particular relevo para o gene BTNL2, que se localiza entre a região HLA-classe II e classe III [64].

O alelo A do polimorfismo rs2076530, foi positivamente associado a sarcoidose em 2005, numa população alemã. Em 2006 Li e colaboradores, descreveram associação deste SNP, com doença crónica também numa população alemã (sem comparação com alelos HLA).

Morais (2012), numa população portuguesa, reporta associações interessantes com este SNP. Demonstrou um aumento da frequência do alelo A do rs2076530 e do genótipo AA, corroborando o papel deste polimorfismo com o risco de desenvolver sarcoidose. Tendo em conta o desequilíbrio de ligação entre BTNL2 e HLA-DR, este autor descreve associação do rs2076530 com Síndrome de Lofgren e doença torácica isolada, e o alelo HLA-DRB1*03 com Síndrome de Lofgren ou doença resolvida [70]. Os resultados por nós obtidos embora sem significado estatístico são semelhantes aos descritos por Moraes e colaboradores.

Resta questionar se os resultados reportados na literatura, relativamente à BTNL2 são devidos à presença alelos DRB1*01, DRB1*03, DRB1*15, entre outros.

Por último, interessantes associações entre o alelo A do rs2076530 têm sido descritas, nomeadamente em patologias com envolvimento inflamatório como a esclerose múltipla, lepra, diabetes tipo 1, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistémico e doença de Graves[70].

Em doentes com contacto frequente com agentes causais, a genotipagem poderá ser importante para determinar o tipo de acompanhamento e tratamento:

- Se um marcador genético estiver associado a um bom prognóstico for associado a sarcoidose, o tratamento pode não ser necessário e a remissão espontânea pode ocorrer. O acompanhamento do doente na prática clínica pode ser limitado em número e frequência, o que obviamente terá implicações profissionais, monetárias e psicológicas para o doente;

- Se um marcador genético estiver associado a um pior prognóstico, o tratamento pode ser iniciado precocemente e os doentes podem ser seguidos com maior frequência, sendo que a probabilidade de o doente vir a desenvolver incapacidade profissional é menor.

CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS FUTURAS

VI. CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS FUTURAS

A sarcoidose é uma doença heterogénea, com um largo espectro de manifestações clínicas. A prevalência e incidência da doença são variáveis. Em Portugal não existem dados sobre estes parâmetros, no entanto, o recurso a registos médico-legais poderá ser extremamente útil na sua determinação. Como referido anteriormente, casos de envolvimento neurológico, renal e cardíaco são detetados em autópsias, o que sugere que a prevalência/incidência da sarcoidose seja maior do que a reportada.

Muitas dúvidas permanecem sobre o mecanismo subjacente ao processo inflamatório que leva a formação do granuloma. Existem estudos que referem associações da sarcoidose com a exposição ao berílio, inseticidas/pesticidas, micobactérias, e fungos, sugerindo que o agente causal possa ser infeccioso. No entanto, nenhuma relação de causalidade foi estabelecida.

Enquanto os fatores ambientais, ocupacionais e infecciosos, na sarcoidose, permanecem por definir, a etnia e a história familiar da doença foram identificadas como fatores de risco para o seu desenvolvimento, o que suporta a existência de fatores de suscetibilidade genética. A região do MHC tem sido alvo de numerosos estudos sugerindo a participação de genes HLA, e mais recentemente do gene BTNL2, na apresentação clínica, expressão fenotípica e prognóstico da sarcoidose.

De acordo com os objectivos a que nos propusemos, apenas nos foi possível demonstrar que os fatores genéticos parecem ter implicações na susceptibilidade da doença e que poderam estar relacionados com os diferentes fenótipos da mesma, no entanto, não conseguimos associar marcadores genéticos ao curso da doença, nem de que forma esta análise poderá ser importante nos casos de sarcoidose profissional. Parece-nos que a estratificação dos doentes deveria ter sido efetuada de acordo com o fenótipo e que o seguimento dos doentes deva ser feito mesmo após resolução do quadro clínico. Avaliar geneticamente os doentes, de acordo com o estadió radiológico, e doença resolvida/não resolvida em particular, parece ser importante, pois resultados interessantes têm sido obtidos, em outras populações, com esta subdivisão[58].

Aumentar o tamanho da amostra também será importante, particularmente no que se refere ao polimorfismo do rs2076530 do gene da BTNL2, dado que associações significativas têm sido descritas noutras coortes. Neste trabalho não nos foi possível replicar o número de doentes estudados noutras séries.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nunes, H., et al., *Sarcoidosis*. Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: p. 46.
2. Thomeer, M., *Epidemiology of sarcoidosis*. Eur Respir J, 2005: p. 13-22.
3. Pietinalho, A., et al., *The frequency of sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan. A comparative epidemiological study*. Sarcoidosis, 1995. **12**(1): p. 61-7.
4. Byg, K.E., N. Milman, and S. Hansen, *Sarcoidosis in Denmark 1980-1994. A registry-based incidence study comprising 5536 patients*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2003. **20**(1): p. 46-52.
5. Thomeer, M., M. Demedts, and K. Vandeuren, *Registration of interstitial lung diseases by 20 centres of respiratory medicine in Flanders*. Acta Clin Belg, 2001. **56**(3): p. 163-72.
6. Yamaguchi, M., et al., *Epidemiological study on sarcoidosis in Japan. Recent trends in incidence and prevalence rates and changes in epidemiological features*. Sarcoidosis, 1989. **6**(2): p. 138-46.
7. Hagerstrand, I. and F. Linell, *The prevalence of sarcoidosis in the autopsy material from a Swedish town*. Acta Med Scand Suppl, 1964. **425**: p. 171-4.
8. Reid, J.D., *Sarcoidosis in coroner's autopsies: a critical evaluation of diagnosis and prevalence from Cuyahoga County, Ohio*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 1998. **15**(1): p. 44-51.
9. Rybicki, B.A., et al., *Racial differences in sarcoidosis incidence: a 5-year study in a health maintenance organization*. Am J Epidemiol, 1997. **145**(3): p. 234-41.
10. Hoffmann, A.L., N. Milman, and K.E. Byg, *Childhood sarcoidosis in Denmark 1979-1994: incidence, clinical features and laboratory results at presentation in 48 children*. Acta Paediatr, 2004. **93**(1): p. 30-6.
11. Chesnutt, A.N., *Enigmas in sarcoidosis*. West J Med, 1995. **162**(6): p. 519-26.
12. Grunewald, J. and A. Eklund, *Sex-specific manifestations of Lofgren's syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(1): p. 40-4.
13. Grunewald, J. and A. Eklund, *Lofgren's syndrome: human leukocyte antigen strongly influences the disease course*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(4): p. 307-12.
14. Iannuzzi, M.C., B.A. Rybicki, and A.S. Teirstein, *Sarcoidosis*. N Engl J Med, 2007. **357**(21): p. 2153-65.
15. Baughman, R.P., E.E. Lower, and R.M. du Bois, *Sarcoidosis*. Lancet, 2003. **361**(9363): p. 1111-8.

16. Nunes, H., P. Soler, and D. Valeyre, *Pulmonary sarcoidosis*. Allergy, 2005. **60**(5): p. 565-82.
17. Valeyre, D., et al., *Sarcoidosis*. Lancet, 2013.
18. Shigemitsu, H., S. Nagai, and O.P. Sharma, *Pulmonary hypertension and granulomatous vasculitis in sarcoidosis*. Curr Opin Pulm Med, 2007. **13**(5): p. 434-8.
19. Judson, M.A., *Extrapulmonary sarcoidosis*. Semin Respir Crit Care Med, 2007. **28**(1): p. 83-101.
20. Holmes, J. and A. Lazarus, *Sarcoidosis: extrathoracic manifestations*. Dis Mon, 2009. **55**(11): p. 675-92.
21. Rizzato, G., *Extrapulmonary presentation of sarcoidosis*. Curr Opin Pulm Med, 2001. **7**(5): p. 295-7.
22. Yanardag, H., O.N. Pamuk, and G.E. Pamuk, *Lupus pernio in sarcoidosis: clinical features and treatment outcomes of 14 patients*. J Clin Rheumatol, 2003. **9**(2): p. 72-6.
23. Mana, J., et al., *Cutaneous involvement in sarcoidosis. Relationship to systemic disease*. Arch Dermatol, 1997. **133**(7): p. 882-8.
24. Nozaki, K. and M.A. Judson, *Neurosarcoidosis: Clinical manifestations, diagnosis and treatment*. Presse Med, 2012. **41**(6 Pt 2): p. e331-48.
25. Lacomis, D., *Neurosarcoidosis*. Curr Neuropharmacol, 2011. **9**(3): p. 429-36.
26. Margolis, R. and C.Y. Lowder, *Sarcoidosis*. Curr Opin Ophthalmol, 2007. **18**(6): p. 470-5.
27. Harder, H., et al., *Extrapulmonary sarcoidosis of liver and pancreas: a case report and review of literature*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2504-9.
28. Vucinic, V., V. Skodric-Trifunovic, and S. Ignjatovic, *How to diagnose and manage difficult problems of calcium metabolism in sarcoidosis: an evidence-based review*. Curr Opin Pulm Med, 2011. **17**(5): p. 297-302.
29. Conron, M., C. Young, and H.L. Beynon, *Calcium metabolism in sarcoidosis and its clinical implications*. Rheumatology (Oxford), 2000. **39**(7): p. 707-13.
30. Costabel, U. and G.W. Hunninghake, *ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders*. Eur Respir J, 1999. **14**(4): p. 735-7.
31. Popper, H.H., *Epithelioid cell granulomatosis of the lung: new insights and concepts*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 1999. **16**(1): p. 32-46.
32. Daly, P.A., et al., *Hodgkin's disease with a granulomatous pulmonary presentation mimicking sarcoidosis*. Thorax, 1988. **43**(5): p. 407-9.

33. Lower, E.E., H.H. Hawkins, and R.P. Baughman, *Breast disease in sarcoidosis*. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2001. **18**(3): p. 301-6.
34. Lynch, J.P., 3rd, E.A. Kazerooni, and S.E. Gay, *Pulmonary sarcoidosis*. *Clin Chest Med*, 1997. **18**(4): p. 755-85.
35. Lynch, J., *Pulmonary Sarcoidosis*. *Eur Respir J*, 2005. **35**: p. 105-129.
36. Drent, M., K. Mansour, and C. Linssen, *Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis*. *Semin Respir Crit Care Med*, 2007. **28**(5): p. 486-95.
37. Mana, J., et al., *Excessive thoracic computed tomographic scanning in sarcoidosis*. *Thorax*, 1995. **50**(12): p. 1264-6.
38. Zajicek, J.P., et al., *Central nervous system sarcoidosis--diagnosis and management*. *QJM*, 1999. **92**(2): p. 103-17.
39. Saidha, S., E.S. Sotirchos, and C. Eckstein, *Etiology of sarcoidosis: does infection play a role?* *Yale J Biol Med*, 2012. **85**(1): p. 133-41.
40. Moller, D.R. and E.S. Chen, *What causes sarcoidosis?* *Curr Opin Pulm Med*, 2002. **8**(5): p. 429-34.
41. Cox, C.E., A. Davis-Allen, and M.A. Judson, *Sarcoidosis*. *Med Clin North Am*, 2005. **89**(4): p. 817-28.
42. *American Thoracic Society. Statement on Sarcoidosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **16**: p. 736-755.
43. Aladesanmi, O.A., *Sarcoidosis: an update for the primary care physician*. *MedGenMed*, 2004. **6**(1): p. 7.
44. Baughman, R.P., et al., *Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **164**(10 Pt 1): p. 1885-9.
45. Newman, L.S., et al., *A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **170**(12): p. 1324-30.
46. Maier, L.A., *Is smoking beneficial for granulomatous lung diseases?* *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **169**(8): p. 893-5.
47. Baughman, R.P., D.A. Culver, and M.A. Judson, *A concise review of pulmonary sarcoidosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. **183**(5): p. 573-81.
48. Noor, A. and K.S. Knox, *Immunopathogenesis of sarcoidosis*. *Clin Dermatol*, 2007. **25**(3): p. 250-8.
49. Rybicki, B.A., et al., *Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS)*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **164**(11): p. 2085-91.
50. Schurmann, M., et al., *Results from a genome-wide search for predisposing genes in sarcoidosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **164**(5): p. 840-6.

51. Morais, A., et al., *HLA class I and II and TNF-alpha gene polymorphisms in sarcoidosis patients*. Rev Port Pneumol, 2008. **14**(6): p. 727-46.
52. Shiina, T., et al., *The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease*. J Hum Genet, 2009. **54**(1): p. 15-39.
53. Hedfors, E. and E. Moller, *HL-A antigens in sarcoidosis*. Tissue Antigens, 1973. **3**(2): p. 95-8.
54. Grunewald, J., A. Eklund, and O. Olerup, *Human leukocyte antigen class I alleles and the disease course in sarcoidosis patients*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(6): p. 696-702.
55. Sharma, S.K., et al., *Human leukocyte antigen-DR alleles influence the clinical course of pulmonary sarcoidosis in Asian Indians*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(2): p. 225-31.
56. Rybicki, B.A. and M.C. Iannuzzi, *Sarcoidosis and human leukocyte antigen class I and II genes: it takes two to tango?* Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(6): p. 665-6.
57. Martinetti, M., M. Luisetti, and M. Cuccia, *HLA and sarcoidosis: new pathogenetic insights*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2002. **19**(2): p. 83-95.
58. Grunewald, J., et al., *Different HLA-DRB1 allele distributions in distinct clinical subgroups of sarcoidosis patients*. Respir Res, 2010. **11**: p. 25.
59. Voorter, C.E., M. Drent, and E.M. van den Berg-Loonen, *Severe pulmonary sarcoidosis is strongly associated with the haplotype HLA-DQB1*0602-DRB1*150101*. Hum Immunol, 2005. **66**(7): p. 826-35.
60. Rybicki, B.A., et al., *The major histocompatibility complex gene region and sarcoidosis susceptibility in African Americans*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(3): p. 444-9.
61. Berlin, M., et al., *HLA-DR predicts the prognosis in Scandinavian patients with pulmonary sarcoidosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(5): p. 1601-5.
62. Foley, P.J., et al., *Human leukocyte antigen-DRB1 position 11 residues are a common protective marker for sarcoidosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(3): p. 272-7.
63. Sato, H., et al., *Sarcoidosis HLA class II genotyping distinguishes differences of clinical phenotype across ethnic groups*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(20): p. 4100-11.
64. Valentonyte, R., et al., *Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 357-64.

65. Arnett, H.A., S.S. Escobar, and J.L. Viney, *Regulation of costimulation in the era of butyrophilins*. Cytokine, 2009. **46**(3): p. 370-5.
66. Arnett, H.A., et al., *BTNL2, a butyrophilin/B7-like molecule, is a negative costimulatory molecule modulated in intestinal inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1523-33.
67. Nguyen, T., et al., *BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7354-60.
68. Rybicki, B.A., et al., *The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(3): p. 491-9.
69. Milman, N., et al., *The BTNL2 A allele variant is frequent in Danish patients with sarcoidosis*. Clin Respir J, 2011. **5**(2): p. 105-11.
70. Morais, A., et al., *BTNL2 gene polymorphism associations with susceptibility and phenotype expression in sarcoidosis*. Respir Med, 2012. **106**(12): p. 1771-7.
71. Chang, B., et al., *Depression in sarcoidosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(2): p. 329-34.
72. Jones, D.C., et al., *Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility*. Genes Immun, 2006. **7**(7): p. 576-82.
73. Olenchock, S.A., et al., *HLA-B8 in sarcoidosis*. Ann Allergy, 1981. **47**(3): p. 151-3.
74. McIntyre, J.A., et al., *Increased HLA-B7 antigen frequency in South Carolina blacks in association with sarcoidosis*. Transplant Proc, 1977. **9**(1 Suppl 1): p. 173-6.
75. Iannuzzi, M.C. and B.A. Rybicki, *Genetics of sarcoidosis: candidate genes and genome scans*. Proc Am Thorac Soc, 2007. **4**(1): p. 108-16.
76. da Costa, C.H., et al., *HLA in a cohort of Brazilian patients with sarcoidosis*. Hum Immunol, 2013. **74**(10): p. 1326-32.

ANEXOS

