

António Morais<sup>1</sup>  
Helena Alves<sup>2</sup>  
Bruno Lima<sup>2</sup>  
Luís Delgado<sup>3</sup>  
Ricardo Gonçalves<sup>2</sup>  
Sandra Tafalo<sup>2</sup>

## Estudo de polimorfismos genéticos do HLA (classes I e II) e do TNF- $\alpha$ em doentes com sarcoidose

### *HLA class I and II and TNF- $\alpha$ gene polymorphisms in sarcoidosis patients*

Recebido para publicação/*received for publication*: 08.03.26  
Aceite para publicação/*accepted for publication*: 08.06.17

#### Resumo

**Introdução:** A susceptibilidade genética na ocorrência da sarcoidose é sugerida por alguns factores, nomeadamente pela observação de casos de agregação familiar e a associação da raça a diferentes tipos de incidência e gravidade da doença. Vários estudos têm evidenciado a associação da classe I e especialmente da classe II do sistema HLA com a susceptibilidade à sarcoidose.

**Objectivos:** Estudo dos polimorfismos genéticos da classe I e II do sistema HLA e do TNF- $\alpha$  num grupo de doentes com sarcoidose, nomeadamente a sua influência na susceptibilidade, apresentação clínica e evolução da doença.

**Material e métodos:** Foram incluídos 104 doentes com sarcoidose, tendo sido estudadas a apresentação clínica, funcional, radiológica e os resultados do LBA. Foram usados métodos de biologia molecular na genotipagem

#### Abstract

**Introduction:** Several factors suggest a genetic predisposition to sarcoidosis, namely the recognition of race as a risk factor and the occurrence of familial clustering of cases. Several studies have reported an association of sarcoidosis and HLA class I and especially class II alleles in different populations.

**Aim:** HLA class I, class II and TNF- $\alpha$  genotyping in a group of sarcoidosis patients and its relation with clinical presentation and outcome.

**Material and methods:** A total of 104 sarcoidosis patients were included. Clinical presentation, functional, radiology, BAL findings and organ involvement were studied. HLA- A\*, -B\*, -C\*, DRB1\*, DQB1\* and TNF- $\alpha$  were genotyped by molecular biology methods. DNA was extracted from peripheral blood and PCR-SSP and PCR-reverse hybridisation me-

<sup>1</sup> Serviço de Pneumologia do Hospital São João, Porto / *Pulmonology Unit, Hospital São João, Porto*

<sup>2</sup> Centro de Histocompatibilidade do Norte / *Histocompatibility Centre of the North*

<sup>3</sup> Serviço de Imunologia da Faculdade de Medicina do Porto / *Pulmonology Unit, Porto Faculty of Medicine*

do HLA-A\*, B\*, C\*, DRB1\*, DQB1\* e TNF- $\alpha$ . O ADN foi extraído do sangue periférico e foram usados os métodos PCR-SSP e PCR-*reverse hybridization*. As frequências alélicas foram comparadas com controlos da mesma região geográfica pelo teste  $\chi^2$ , sendo usado o teste Kruskal-Wallis para variáveis contínuas.

**Resultados:** Comparativamente com os controlos, os doentes incluídos apresentavam frequências aumentadas de: B\*08 (10,6% *vs* 6,1%), OR=1,8, IC=[1,1;3,1],  $p=0,02$ ; DRB1\*12 (4,3% *vs* 1,7%), OR=2,63, IC=[1,1;6,1],  $p=0,03$ . Os doentes com eritema nodoso apresentaram aumento das frequências alélicas de DRB1\*03 (28% *vs* 9,3%), RR=2,39, IC=[1,5;3,8],  $p_c=0,01$  e DQB1\*02 (38% *vs* 18%), RR=2,1, IC=[1,3;3,3],  $p_c=0,02$ . O alelo DQB1\*03 está diminuído nos doentes que apresentam síndrome ventilatória obstrutiva, RR=0,53, IC=[0,3;0,9],  $p_c=0,05$ . O alelo DRB1\*15 encontra-se significativamente associado quer à síndrome ventilatória restritiva quer à diminuição da transferência alveolocapilar (21,1% *vs* 6,6%), RR=2,46, IC=[1,35;4,48],  $p=0,01$  e (18,1% *vs* 3,8%), RR=1,87,  $p_c=0,05$ , respectivamente. Por sua vez, o genótipo A/A (*high*) do TNF- $\alpha$  apresentou uma frequência aumentada ( $p=0,04$ ) nos doentes com eritema nodoso.

**Conclusões:** Os resultados obtidos adicionam evidência ao facto de, quer a classe I quer a classe II do sistema HLA influenciarem a susceptibilidade, o tipo de apresentação, o grau de gravidade e a evolução na sarcoidose. Por outro lado, o eritema nodoso parece relacionar-se com o genótipo de elevada produção de TNF- $\alpha$ , associação esta já anteriormente descrita.

**Rev Port Pneumol 2008; XIV (6): 727-746**

**Palavras-chave:** Sarcoidose, genética, HLA.

thods were used. Allele frequencies were compared with controls from the same region. The  $X^2$  test was used for discrete values and the Kruskal-Wallis test for continuous values.

**Results:** When patients were compared with controls we noticed increased frequencies of B\*08 (10.6% *vs* 6.1%), O.R.=1.8, C.I.=[1.1;3.1],  $p=0.02$ ; DRB1\*12 (4.3% *vs* 1.7%), O.R.=2.63, C.I.=[1.1;6.1],  $p=0.03$ . Patients with erythema nodosum have increased frequencies of the alleles DRB1\*03 (28% *vs* 9.3%), R.R.=2.39, C.I.=[1.5;3.8],  $p_c=0.01$  and DQB1\*02 (38% *vs* 18%), R.R.=2.1, C.I.=[1.3;3.3],  $p_c=0.02$ . Allele DQB1\*03 is decreased in patients with obstructive pattern R.R.=0.53, C.I.=[0.3;0.9],  $p_c=0.05$ . Allele DRB1\*15 is related to restrictive pattern and reduced diffusion capacity (21.1% *vs* 6.6%), R.R.=2.46, C.I.=[1.35;4.48],  $p=0.01$  and (18.1% *vs* 3.8%), R.R.=1.87,  $p_c=0.05$  respectively. The TNF- $\alpha$  A/A (*high*) genotype is significantly associated with erythema nodosum ( $p=0.04$ ).

**Conclusions:** These data add support to the genetic association of HLA class I and II with sarcoidosis in terms of susceptibility, type of presentation, severity and outcome. Moreover as previously described in other populations, the TNF- $\alpha$  A/A (*high*) genotype has a significant association with erythema nodosum.

**Rev Port Pneumol 2008; XIV (6): 727-746**

**Key-words:** Sarcoidosis, genetics, HLA.

## Introdução

A sarcoidose é uma doença associada a uma inflamação granulomatosa com envolvimento multissistémico<sup>1,2,3</sup>. O envolvimento torácico é o mais comum, afectando cerca de 90% dos doentes<sup>1,2,3</sup>. A sua causa não é conhecida, conjecturando-se que possa ser resultante da exposição a um agente ambiental por parte de um indivíduo com predisposição para desenvolver a doença<sup>1,2,3</sup>. Alguns dos factores que sugerem a predisposição genética são a ocorrência de agregação familiar, descrita com um risco relativo entre 5-10%, e a diferente prevalência, tipo de apresentação clínica e grau de gravidade associados a diferentes raças e regiões, como é exemplo a maior incidência e gravidade da doença nos negros americanos comparativamente com os caucasianos<sup>4,5</sup>. Existem vários estudos sobre polimorfismos genéticos e a sua associação com a susceptibilidade da doença, como por exemplo os relacionados com o sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC), com os genes das citocinas ou das quimocinas participantes na resposta imunológica da sarcoidose ou com o gene da enzima de conversão da angiotensina sérica (SACE)<sup>4</sup>.

O sistema HLA localizado no braço curto do cromossoma 6 participa na regulação da resposta imune, nomeadamente através do reconhecimento de antígenos, no seu processamento e na sua apresentação aos linfócitos CD4 através da sua classe II, ou aos linfócitos CD8 pela sua classe I<sup>6,7</sup>. Por outro lado, as citocinas são fundamentais para a comunicação celular e, conseqüentemente, podem ser elementos determinantes na modulação da resposta imune. Vários estudos têm permitido estabelecer uma conexão entre determinados génotipos das citocinas participantes na res-

## Introduction

Sarcoidosis is a multisystem disorder characterised by granulomatous inflammation<sup>1,2,3</sup>. Thoracic involvement is the most common, affecting more than 90% of patients<sup>1,2,3</sup>. While the aetiology of sarcoidosis remains unknown, it is believed to be the result of the exposure to one or more antigens by a genetically susceptible host<sup>1,2,3</sup>. Some factors suggesting genetic predisposition are familial clustering and the different prevalence, clinical presentation and degree of severity associated to different races and regions, for example the greater incidence and severity among Afro-Americans than Caucasians<sup>4,5</sup>. There are several studies about genetic polymorphisms and its association to disease predisposition, including those related to the human leukocyte antigen (HLA) of the major histocompatibility complex (MHC) region, with the genes codifying cytokines or chemokines participating in the immunological response or those related to the serum angiotensin converting enzyme<sup>4</sup>.

The HLA system, located on the short arm of chromosome 6, participates in regulating the immune response namely through the recognition of antigens, in its processing and its presentation to CD4 lymphocytes by class II or to CD8 lymphocytes by class I<sup>6,7</sup>. On the other hand, cytokines are vital for cellular communication and consequently can be determining elements in modulating the immune response. A raft of studies has established a connection between specific genotypes of the cytokines which participate in the immune response of sarcoidosis and their levels. The polymorphisms in the promoter regions of these genes have functional significance and could

---

**O sistema HLA localizado no braço curto do cromossoma 6 participa na regulação da resposta imune**

posta imune da sarcoidose e os níveis das mesmas. Os polimorfismos nas regiões promotoras destes genes têm significado funcional, podendo estar envolvidos na susceptibilidade ou severidade de várias doenças, nomeadamente de natureza autoimune ou de etiologia infecciosa. Estes polimorfismos estão relacionados com níveis diferentes de produção de citocinas em células específicas (linfócitos, monócitos e macrófagos). Dada a sua localização no MHC, o TNF- $\alpha$  foi igualmente objecto de análise no âmbito deste estudo.

### Objectivos

Estudo da associação de polimorfismos das classes I e II do sistema HLA e do TNF- $\alpha$  com a susceptibilidade da sarcoidose, assim como a eventual influência na sua forma de apresentação clínica, funcional e radiológica, na sua gravidade e evolução.

### Material e métodos

#### Amostra do estudo

Neste estudo foram incluídos 104 doentes do Norte de Portugal diagnosticados com sarcoidose. Em 76 (73,1%) obteve-se confirmação histológica de sarcoidose. Os restantes apresentavam alterações radiológicas (estádio I ou II) e do LBA (linfocitose com relação CD4/CD8 > 3,5) que permitiram fazer o diagnóstico de acordo com o *statement* da ERS/ATS/WASOG<sup>1</sup>. Por outro lado, todos os casos sem confirmação histológica foram seguidos pelo menos durante dois anos, não havendo na sua evolução qualquer alteração sugestiva de outro diagnóstico.

Os doentes incluídos foram tipados para os *loci* HLA-A\*, -B\*, -C\*, -DRB1\* e -DQB1\* do

be involved in the susceptibility to or severity of various diseases, namely of an autoimmune nature or with infectious aetiology. These genotypes are related to different levels of cytokine production in specific cells (lymphocytes, monocytes and macrophages). As TNF- $\alpha$  is located on the MHC complex its genetic polymorphisms were also analysed in this study.

### Aims

Study of the association between HLA class I, class II and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms with sarcoidosis susceptibility and their influence on clinical, functional and radiologic presentation as well as in the severity and disease course.

### Material and Methods

#### Study sample

We included 104 patients from the north of Portugal diagnosed with sarcoidosis. Seventy six (73.1%) patients had histological confirmation of sarcoidosis. The remainder presented radiology stages I or II, bronchoalveolar lavage (BAL) with lymphocytosis associated to CD4/CD8 ratio >3.5 and met the ERS/ATS/WASOG Statement diagnostic criteria<sup>1</sup>. All cases which did not have histological confirmation were monitored for at least 2 years and there was no occurrence that suggested another diagnosis.

All patients studied were genotyped for the HLA-A\*, -B\*, -C\*, -DRB1\* and -DQB1\* loci. Allele frequencies were compared with controls from the same region, consisting of 650 subjects, 51.1% female,

HLA. As frequências alélicas foram comparadas com controlos do Norte de Portugal, não tendo nenhum a doença estudada. A população-controlo era constituída por 650 indivíduos, 51,1% dos quais do sexo feminino, tipados para os loci HLA-A\*, -C\*, -B\* e -DRB1\*, e 405 tipados em -DQB1\*. Dos doentes que fazem parte deste estudo, 83 foram tipados para o TNF- $\alpha$ , sendo as frequências dos génotipos comparadas com as frequências de 124 controlos. Foi analisada a região promotora desta citocina, que apresenta um polimorfismo relacionado com diferentes produções de TNF- $\alpha$ , estando os génotipos relacionados com o nível de produção desta citocina. Foi estudado o polimorfismo na posição -308, dado que se verificou que os altos respondedores são os que têm o génotipo TNF- $\alpha$ -308 A, podendo estar em homozigotia A/A (*high/high*) ou em heterozigotia A/G (*high/low*)."

### Genotipagem

O ADN foi extraído a partir de sangue periférico fresco por um procedimento de *salting-out* com 6M NaCl seguido de incubação de 1h com proteinase K.

A genotipagem dos loci HLA-A\*, -B\*, -C\*, -DRB1\* e -DQB1\* foi feita pela técnica PCR-SSP (*sequence specific primers*) em que os pares de *primers* escolhidos, específicos de determinada sequência, só amplificam quando o terminal 3' do *primer* é complementar da sequência-alvo. Portanto, os alelos ou grupo de alelos são determinados pela presença de produto da PCR específico.

Os polimorfismos genéticos da citocina TNF- $\alpha$  foram determinados através da técnica de PCR-SSP (utilizando *kits* comerciais da One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA). Os fragmentos de ADN amplificado

genotipado para os loci HLA-A\*, -C\*, -B\* e -DRB1\* e 405 genotipado para -DQB1\*. Eighty three patients were also genotyped for TNF- $\alpha$ , and these genotype frequencies were compared with the frequencies of 124 controls. The promoter region of this cytokine presented a polymorphism related to the different TNF- $\alpha$  productions, with genotypes associated to the level of production of this cytokine. The polymorphism in position -308 was analysed since it was verified that the high responders are those with the TNF- $\alpha$ -308 A genotype, which can be in homozygosity AA (high/high) or in heterozygosity AG (high/low).

### Genotyping

DNA was isolated from fresh peripheral blood using a salting out procedure with 6M NaCl followed by a 1hr incubation with proteinase K.

The HLA-A\*, -B\*, -Cw\*, -DRB1\* and -DQB1\* genotyping was performed by PCR-SSP Sequence Specific primers (Olerup SSP, GenoVision VertriebsgesmbH, Vienna, Austria). In this method the pairs of the chosen primers are sequence specific, only amplifying when the terminal 3' of the primer are complementary to the target sequence and alleles are determined by the presence of the specific PCR product by agarose gel electrophoresis stained by ethidium bromide.

The TNF- $\alpha$  cytokine genotyping was determined using the same method, PCR-SSP, (One Lambda Inc., CA, USA) and the results interpretation was based on the presence or absence of specific fragments of amplified DNA.

foram depois separados através de electroforese em gel de agarose e posteriormente visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição a luz ultravioleta.

A interpretação dos resultados baseia-se na presença ou ausência de fragmentos específicos de ADN amplificado. Tendo em conta que, durante a reacção de PCR, a amplificação pode ser afectada por vários factores, é incluído um controlo interno em cada reacção de PCR (amplificação de uma região conservada do gene da  $\beta$ -globulina humana, presente em todas as amostras de ADN), de modo a verificar a integridade de cada reacção. Uma reacção positiva para um alelo específico de uma citocina, ou para um grupo de alelos, é visualizada no gel como um fragmento de ADN amplificado situado entre a banda do produto do controlo interno e a banda de *primers* não incorporados (Fig. 1).

#### Análise estatística

A comparação das frequências dos doentes com os controlos foi feita com o teste  $\chi^2$ , tendo sido utilizada a correção de Fisher sempre que se justificou. Os valores de *p* do teste  $\chi^2$  foram corrigidos para as múltiplas comparações (*p<sub>c</sub>*) através da fórmula  $p_c = 1 - (1 - p)^n$ , sendo *n* o número de alelos por cada *locus* ou o número de genótipos para a citocina (*n*=17 para A\*; *n*=24 para B\*; *n*=13 para C\*; *n*=13 para DRB1\*; *n*=5 para DQB1\*). Os valores de *p* são considerados estatisticamente significativos quando inferiores a 0,05. *Odds ratio* (OR), risco relativo (RR) e intervalos de confiança (IC) a 95% foram calculados para quantificar as possíveis associações. Foram também calculadas as frequências relativas (%) de cada alelo ou genótipo em cada grupo. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado

As amplification can be affected by various factors during the PCR reaction, an internal control was included for each PCR reaction, an amplification of a conserved region of the human  $\beta$ -globulin gene (Fig. 1).

#### Statistical analysis

HLA allele frequencies were determined by direct counting for controls and sarcoidosis patients. The  $\chi^2$  test or Fisher exact test, when appropriate, were used to assess the association of various alleles with sarcoidosis susceptibility, evolution and severity. The *p* values were corrected for the multiple comparisons (*p<sub>c</sub>*) using the formula  $p_c = 1 - (1 - p)^n$ , with *n* the number of alleles at each locus or the number of genotypes for the cytokine (*n*=17 for A\*; *n*=24 for B\*; *n*=13 for C\*; *n*=13 for DRB1\*; *n*=5 for DQB1\*; *n* = 3 for TNF). Odds Ratio (O.R.), Relative Risk (R.R.) and confidence intervals (C.I) at 95% were calculated to quantify the possible associations.

The Kruskal-Wallis test was used to compare mean values of the lymphocyte, neutrophil and CD4/CD8 ratio counts.

Correcting *p* values for multiple comparisons is common practice in HLA association studies as the loci of this region are very polymorphic and using corrected values ensures that any associations found are not by chance. The alternative to correcting *p* values for the multiple comparisons is the replication of the results with uncorrected *p*-values. This is why we chose to present both the *p* values corrected for multiple comparisons (*p<sub>c</sub>*) and the uncorrected ones (*p*). Statistically significant uncorrected *p* values can be considered indicators of future study hypotheses.

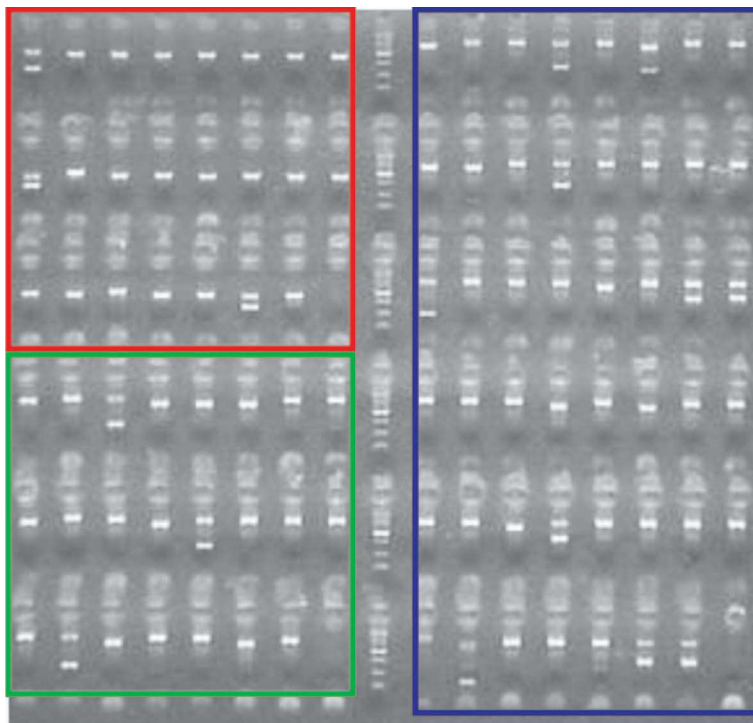


Fig. 1 – Tipagem HLA. Electroforese dos produtos PCR em gel de agarose. Tipagem HLA-DRB1\*, -A\* e -B\*

Fig. 1 – HLA Typing. Agarose gel electrophoresis of the PCR products. HLA-DRB1\*, -A\* and -B\* typing.

para testar a hipótese de os valores médios das contagens de linfócitos, neutrófilos e da razão CD4/CD8 serem iguais. O recurso à correcção para múltiplas comparações dos valores de *p* é prática comum nos estudos de associação alélica com o HLA, dado que os *loci* desta região são muitos polimórficos, e recorrendo aos valores corrigidos garante-se que as possíveis associações encontradas não são fruto do acaso. A alternativa à correcção dos valores de *p* para as múltiplas comparações passa pela replicação dos resultados com valores de *p* não corrigidos estatisticamente significativos. É por esta razão que neste trabalho são apresentados tanto os valores de *p* corrigidos para as múltiplas comparações (*p<sub>c</sub>*) como os valores de *p* não corrigidos (*p*), devendo

The *p* values lower than 0.05 were considered statistically significant. All the statistical analysis was performed using the SPSS v11.5 and EpiInfo software programs.

## Results

### Patient study sample

One hundred and four sarcoidosis patients with a mean age of  $38.1 \pm 11.3$  years old were included in this study and 64 (61.5%) patients were female. Ten (9.6%) patients were asymptomatic at the time of diagnosis. Dyspnoea (48%), cough (43.2%) and erythema nodosum (EN) (25%) were the most common clinical symptoms or signs in symp-

estes ser tidos em conta sempre que haja dados na literatura que sejam coincidentes. Valores de *p* não corrigidos estatisticamente significativos podem ser considerados como indicadores de futuras hipóteses de estudo. Toda a análise estatística foi feita utilizando os *softwares* SPSS v11.5 e EpiInfo.

## Resultados

### Amostra dos doentes estudada

Os 104 doentes estudados apresentavam uma média de idades de  $38,1 \pm 11,3$  anos, sendo 64 (61,5%) do sexo feminino. Dez (9,6%) doentes estavam assintomáticos na altura em que foi efectuado o diagnóstico, sendo nos sintomáticos a dispneia (48%), a tosse (43,2%) e o eritema nodoso (EN) (25%) os sintomas/sinais clínicos mais comuns. No estudo funcional efectuado inicialmente, 43,6% dos doentes não apresentaram alterações, 21,8% apresentavam diminuição dos débitos expiratórios intermédios, 12,6% síndrome ventilatória obstrutiva, 18,3% síndrome ventilatória-restritiva e 3,4% síndrome ventilatória mista. Os estádios radiológicos, segundo observação da TAC torácica, com cortes de alta resolução, distribuíam-se da seguinte forma: I– 33,7%, II–46,9%, III– 10,8%, IV–8,13%. Observou-se envolvimento extratorácico em 45,2% dos doentes incluídos. Foi possível determinar com precisão a evolução clínica em 81 doentes, verificando-se regressão total da doença em 39 (48,1%) e evolução para a cronicidade em 42 (51,9%), tendo estes últimos pelo menos dois anos de seguimento em consulta. Dos doentes incluídos, 74 (71,2%) realizaram lavado broncoalveolar (LBA) no estudo efectuado na altura do diagnóstico. O valor médio dos linfócitos era de  $40,1 \pm 19,2$ , da relação

tomatic patients. At diagnosis 43.6% of the patients had no functional abnormalities, 21.8% presented decreased intermediate expiratory flow, 12.6% obstructive ventilatory pattern, 18.3% restrictive ventilatory pattern and 3.4% mixed ventilatory pattern. The radiology staging according to HRCT scan features was I– 33.7%, II– 46.9%, III– 10.8%, IV– 8.13%. 45.2% patients had extra-thoracic involvement. A precise determination of the clinical outcome was possible in 81 patients. 39 (48.1%) had total disease remission, and 42 (51.9%) had progressed to chronic status, with this latter being followed-up for at least 2 years. 74 (71.2%) of the patients had undergone BAL in the study performed at diagnosis. The mean lymphocyte count was  $40.1 \pm 19.2$ , the mean CD4/CD8– ratio  $5.8 \pm 4.9$  and the mean neutrophil count  $3.2 \pm 4.9$ .

### HLA classes I and II study

The comparison of HLA allelic frequencies between patients and controls showed the alleles HLA-B\*08 (O.R.=1.83), DRB1\*03 (O.R.=1.83) and DRB1\*12 (O.R.=2.63) positively associated with disease susceptibility, although *p* values were not statistically significant when corrected for multiple comparisons. While B\*44, B\*51, C\*14, DRB1\*04, DRB1\*07 and DRB1\*08 allelic frequencies were decreased in patients with sarcoidosis compared with healthy control subjects, the *p* values were not statistically significant when corrected for multiple comparisons (Table I).

The alleles DRB1\*03 (R.R.=2.39) and DQB1\*02 (R.R.=2,05) had the greatest association to EN patients, and their *p* values retained statistical significance after multi-



## ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HLA (CLASSES I E II) E DO TNF- $\alpha$ EM DOENTES COM SARCIDOSE

António Morais, Helena Alves, Bruno Lima, Luís Delgado, Ricardo Gonçalves, Sandra Tafalo

**Quadro I** – Comparação das frequências alélicas entre os doentes com sarcoidose e a população-controlo. Na amostra de doentes estudada, foram observadas relações entre haplótipos quer da classe 1 quer da classe 2 do HLA e a susceptibilidade da doença, que no entanto não se revelaram significativas na correcção para as múltiplas comparações (pc).

**Table I** – Comparison of allelic frequencies between sarcoidosis patients and the control population. While relationships between class I and class II haplotypes and susceptibility to disease were seen in the patient sample studied, this did not maintain statistical significance when adjusted for the multiple comparisons (pc).

alelo/allele	sarcoidose/ sarcoidosis		controlos/ controls		p	pc	OR	95% CI
	n	%	n	%				
B*44	17	8.2	185	14.2	0.02	ns	0.54	]0.31;0.92[
B*51	13	6.3	138	10.6	0.05	ns	0.56	]0.3;1.04[
C*14	1	0.5	42	3.2	0.03	ns	0.14	]0.0;0.86[
DRB1*04	17	8.2	180	13.8	0.02	ns	0.55	]0.32;0.95[
DRB1*07	22	10.6	225	17.3	0.01	ns	0.57	]0.35;0.92[
DRB1*08	4	1.9	69	5.3	0.03	ns	0.35	]0.09;0.95[
B*08	22	10.60	79	6.10	0.02	ns	1.83	]1.08;3.08[
DRB1*03	29	13.90	119	9.20	0.03	ns	1.61	]1.02;2.53[
DRB1*12	9	4.30	22	1.70	0.03(f)	ns	2.63	]1.1;6.09[

(f) valor para o teste exacto de Fisher / *Fisher exact test value*

ns – valores estatisticamente não significativos / *non-statistically significant values*

CD4/CD8–  $5,8 \pm 4,9$  e dos neutrófilos  $3,2 \pm 4,9$ .

### Estudo do sistema HLA– classes I e II

Da comparação das frequências alélicas do HLA dos doentes com os controlos verifica-se que os alelos B\*08 (OR=1,83), DRB1\*03 (OR=1,83) e DRB1\*12 (OR=2,63) são os mais associados à doença, não apresentando no entanto significância estatística quando os seus valores de p são corrigidos para as múltiplas comparações. As frequências dos alelos B\*44, B\*51, C\*14, DRB1\*04, DRB1\*07 e DRB1\*08 têm as frequências diminuídas nos doentes, não sendo igualmente os valores de p, quando corrigidos para múltiplas comparações, estatisticamente significativos (Quadro I).

Em relação à apresentação clínica, os alelos DRB1\*03 (RR=2,39) e DQB1\*02 (RR=2,05)

foram associados à doença, mas não foram significativos após correcção para múltiplas comparações (p<sub>c</sub>=0.01 e p<sub>c</sub>=0.02, respectivamente) (Tabela II).

A análise da função pulmonar mostrou um aumento da frequência do alelo DRB1\*15 em doentes com padrão ventilatório restritivo (21.1% vs. 6.6%, R.R.=2.46, C.I.=[1.35;4.48], p=0.01) e também em doentes com capacidade de difusão diminuída, mas apenas o último mantém estatisticamente significativos os valores de p após correcção para múltiplas comparações (18.1% vs. 3.8%; R.R.=1.87; p<sub>c</sub>=0.05). A frequência do alelo DQB1\*03 é diminuída na síndrome ventilatória obstrutiva (20% vs. 38.6%), R.R.=0.53, C.I.=[0.3;0.9], p<sub>c</sub>=0.05 em comparação com os restantes. (Tabela III).

Os alelos B\*14, C\*08 e DRB1\*11 parecem estar associados às formas mais graves da doença, definidas pelas fases radiológicas III e IV (R.R.=2.52; R.R.=2.52 e R.R.=2.31

**Quadro II** – Comparação das frequências alélicas entre os doentes com e sem eritema nodoso. Verifica-se uma associação significativa com os alelos DRB1\*03 e DQB1\*02

**Table II** – Comparison of allelic frequencies between patients with and without erythema nodosum. A significant association with the DRB1\*03 and DQB1\*02 alleles was seen

alelo/allele	c/ Eritema nodoso/ w/ EN		s/Eritema nodoso/ n/ EN		p	pc	R.R.	95% C.I.
	n	%	n	%				
DRB1*04	0	0.0	16	10.7	0.01(f)	ns		
DRB1*06	10	20.0	40	26.7	0.03	ns	0.46	]0.21;1.0[
B*51	7	14.0	5	3.3	0.01(f)	ns	2.55	]1.48;4.4[
DRB1*03	14	28	14	9.3	0.001	0.01	2.39	]1.49;3.82[
DQB1*02	19	38.0	27	18.0	0.004	0.02	2.05	]1.29;3.27[

(f) valor para o teste exacto de Fisher / *Fisher exact test value*

ns – valores estatisticamente não significativos / *non-statistically significant values*

são os que mostram maior associação com os doentes com EN, sendo os seus valores de p estatisticamente significativos depois de corrigidos para as múltiplas comparações ( $p_c=0,01$  e  $p_c=0,02$  respectivamente) (Quadro II).

Na análise efectuada ao estudo funcional respiratório, salienta-se a frequência aumentada do alelo DRB1\*15 nos doentes com síndrome ventilatória restritiva (21,1% *vs* 6,6%, RR=2,46, IC=[1,35;4,48],  $p=0,01$ ) e também naqueles com diminuição da transferência alveolocapilar, sendo apenas nestes o valor de p estatisticamente significativo quando corrigido para múltiplas comparações (18,1% *vs* 3,8%; RR=1,87;  $p_c=0,05$ ). Por sua vez, o alelo DQB1\*03 está diminuído nos doentes que apresentam síndrome ventilatória obstrutiva, (20% *vs* 38,6%), RR=0,53, IC=[0,3;0,9],  $p_c=0,05$  (Quadro III).

Os alelos B\*14, C\*08 e DRB1\*11 parecem estar associados com as formas mais graves da doença, definidas pelo estágio radiológico III e IV (RR=2,52; RR=2,52 e RR=2,31, respectivamente). No entanto, os valores de p, depois de corrigidos, não são estatisticamente significativos.

respectively). However after multiple comparison correction, p values did not attain statistical significance.

Patients with hepatic and cutaneous involvement were studied separately. There were 21 patients (20.1%) in each category. Those with hepatic involvement had increased frequencies of alleles B\*14 (16.7% *versus* 5.8% with  $p=0.05$ ), R.R. = 2.25 and 95% C.I. = [1.2;4.2] and C\*08 (16.7% *versus* 5.8% with  $p=0.05$ ), and decreased frequencies of C\*12 (0% *versus* 9.1% with  $p=0.04$ ). Patients with cutaneous involvement had increased frequencies of A\*66 (7.1% *versus* 0.6% with  $p=0.03$ ), R.R. = 3.73 and 95% C.I. = [1.98;7.02] and DRB1\*04 (16.7% *versus* 5.8% with  $p=0.05$ ), R.R. = 2.28 and 95% C.I. = [1.21;4.27]. None of these results attained statistical significance when corrected for multiple comparisons. No other extrathoracic localization was analysed, due to the scarcity of patients with any other kind of organ involvement.

An analysis of BAL results suggests that allele C\*04 seemed to have a protection effect

## ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HLA (CLASSES I E II) E DO TNF- $\alpha$ EM DOENTES COM SARCÓIDOSE

António Morais, Helena Alves, Bruno Lima, Luís Delgado, Ricardo Gonçalves, Sandra Tafalo

**Quadro III** – Comparação das frequências alélicas entre os doentes com síndrome ventilatória obstrutiva no Quadro I e com síndrome ventilatória restritiva no Quadro II e os outros doentes. No primeiro grupo verificou-se uma associação significativa entre o alelo DQB1\*03 e no segundo um aumento significativo de DRB1\*15

**Table III** – Comparison of allelic frequencies between patients with obstructive ventilatory syndrome in the Table I and restrictive ventilatory syndrome in Table II and table and the other patients. In the first group a significant association between the DQB1\*03 allele and in the second a significant increase in DRB1\*15 was seen

alelo/allele	obstrutivo/ obstructive		outros/ others		p	pc	RR	95% CI
	n	%	n	%				
DRB1*11	3	5.0	18	15.8	0.04	ns	0.38	]0.13;1.12[
DQB1*03	12	20.0	44	38.6	0.01	0.05	0.53	]0.3;0.91[
A*02	19	31.7	20	17.5	0.03	ns	1.60	]1.06;2.42[
B*41	6	10.0	1	0.9	0.007(f)	ns	2.65	]1.82;3.85[
C*17	6	10.0	1	0.9	0.007(f)	ns	2.65	]1.82;3.85[
DRB1*08	4	6.7		0.0	0.01(f)	ns	3.04	]2.45;3.76[
DRB1*13	18	30.0	15	13.2	0.007	ns	1.83	]1.23;2.74[
alelo/allele	restritivo/ restrictive		outros/ others		p	pc	RR	95% CI
	n	%	n	%				
DRB1*15	8	21.1	9	6.6	0.01(f)	ns	2.46	]1.35;4.48[

(f) valor para o teste exacto de Fisher / *Fisher exact test value*

ns – valores estatisticamente não significativos / *non-statistically significant values*

Nos doentes com envolvimento extratorácico não foram encontrados alelos com frequências significativamente aumentadas. Foram estudados separadamente os doentes com envolvimento hepático e cutâneo (em cada uma das apresentações observaram-se 21 doentes-20,1%). Os doentes com atingimento hepático apresentavam frequências aumentadas dos alelos B\*14 (16,7% versus 5,8% com  $p=0.05$ ), RR= 2,25 e 95% CI= [1,2;4,2] e C\*08 (16,7% versus 5,8% com  $p=0.05$ ), comportando-se o alelo C\*12 como protector (0% versus 9,1% com  $p=0,04$ ). Por sua vez, os doentes com envolvimento cutâneo apresentaram frequências aumentadas de A\*66 (7,1% versus 0,6% com  $p=0.03$ ), RR=3,73 e 95% CI=[1,98;7,02] e DRB1\*04 (16,7% versus 5,8% com  $p=0.05$ ), RR=2,28 e 95% CI=[1,21;4,27]. Estes resultados, no

on the CD4/CD8 > 3.5 ratio (R.R.=0.37,  $pc=0.04$ ) (Table IV).

Allele DRB1\*04 frequencies were increased in patients who progressed to chronic state as compared to those patients who experienced remission. The values did not attain statistical significance once the p values were corrected for multiple comparisons. Alleles A\*01, B\*18 and DRB1\*03 had decreased frequencies in patients who progressed to chronic state but these values did not attain statistical significance either, once p values were corrected for multiple comparisons.

### Studying the TNF- $\alpha$ promotor genotypes

We founded increased A/A (high) genotype frequencies in patients with EN compared to other patients in the study ( $p=0.04$ ). No

**Quadro IV** – Comparação das frequências alélicas entre os doentes com diferente relação CD4/CD8 no lavado bronco-alveolar. O alelo C\*04 apresentou-se significativamente aumentado nos doentes com relação CD4/CD8 < 3,5, mostrando uma tendência para se associar a uma menor expansão de linfócitos CD4+ no pulmão profundo

**Table IV** – Comparison of allelic frequencies between patients with different CD4/CD8 ratio in bronchoalveolar lavage. The C\*04 allele is significantly increased in patients with a CD4/CD8 < 3.5 ratio, showing a tendency to be associated to a lesser increase of CD4+ lymphocytes in the deep lung

alelo/allele	CD4/CD8 $\geq$ 3,5		CD4/Cd8 > 3,5		p	pc	RR	95% CI
	n	%	n	%				
B*35	5	7.1	13	22.4	0.01	ns	0.47	]0.22;1.01[
C*04	4	5.7	14	24.1	0.003	0.04	0.37	]0.15;0.89[
B*07	8	11.4		0.0	0.008(f)	ns	1.94	]1.63;2.3[

(f) valor para o teste exacto de Fisher / *Fisher exact test value*

ns – valores estatisticamente não significativos / *non-statistically significant values*

entanto, não mantiveram significância quando corrigidos para as múltiplas comparações. Não foi analisado nenhum outro envolvimento orgânico, dado o escasso número da amostra relativo ao envolvimento em outros órgãos.

No estudo dos resultados do LBA, o alelo C\*04 parece ter um efeito protector para valores da razão CD4/CD8 > 3,5 (RR=0,37, pc=0,04) (Quadro IV).

As frequências do alelo DRB1\*04 estão aumentadas nos doentes que evoluíram para cronicidade quando comparadas com a dos que apresentam regressão (valores estatisticamente não significativos, após correcções de p). Já os alelos A\*01, B\*18 e DRB1\*03 têm as suas frequências diminuídas nos doentes que evoluem para cronicidade, não sendo igualmente os valores de p, quando corrigidos, estatisticamente significativos.

#### Estudo dos genótipos promotores de TNF- $\alpha$

Analisando os genótipos da citocina TNF- $\alpha$  em relação ao EN, o genótipo A/A (*high*) tem uma frequência aumentada (p=0,04).

other statistically significant associations were found between TNF- $\alpha$  genotypes and the studied population (Table V).

#### Discussion

The first aim of our study was the genetic analysis of the HLA system in a sample of sarcoidosis patients from the north of Portugal whose characteristics could be said to be representative, namely in terms of clinical presentation and radiology findings distribution. Since there are a group of patients whose clinical and radiological presentation strongly suggests sarcoidosis and in whom histological confirmation is not required, for example those with Löfgren's syndrome, this led us to include some patients who met ATS/ERS/WASOG diagnostic criteria but who did not have histological confirmation. We felt their non-inclusion would take representativity from the sample.

Studies into the association between the HLA system and sarcoidosis initially focussed on HLA class I. Several publications described associations between class

## ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HLA (CLASSES I E II) E DO TNF- $\alpha$ EM DOENTES COM SARCÓIDOSE

António Morais, Helena Alves, Bruno Lima, Luís Delgado, Ricardo Gonçalves, Sandra Tafalo

**Quadro V** – Comparação dos genótipos da citocina TNF- $\alpha$  em doentes com e sem eritema nodoso (EN). O genótipo correspondente aos altos produtores de TNF- $\alpha$  apresenta uma associação estatisticamente significativa com os doentes que apresentam eritema nodoso

**Table V** – Comparison of cytokine TNF- $\alpha$  genotypes in patients with and without erythema nodosum (EN). The genotype corresponding to the high TNF- $\alpha$  producers presents a statistically significant association with patients presenting erythema nodosum

	c/EN w/EN		s/EN n/EN		p	RR	95% CI
	n	%	n	%			
A/A (HIGH)	3	13,0	1	1,4	0,04(f)	3,45	]1,74;6,85[
G/A (HIGH)	6	26,1	17	23,3	ns		
G/G (LOW)	14	60,9	55	75,3	ns		

(f) valor para o teste exacto de Fisher / *Fisher exact test value*

ns – valores estatisticamente não significativos / *non-statistically significant values*

Não foram encontradas outras associações com significância em relação à doença estudada (Quadro V).

### Discussão

O trabalho descrito teve como objecto de estudo uma população de doentes com sarcoidose do Norte de Portugal, com características que se pretenderam representativas, nomeadamente em relação à sua apresentação clínica e distribuição radiológica. O facto de haver uma percentagem importante de doentes cuja apresentação clínica e radiológica é francamente sugestiva de sarcoidose e não necessitarem de confirmação histológica, como é exemplo aqueles que cursam com síndrome de Löfgren, levou-nos à inclusão de alguns doentes que apresentavam os critérios de diagnóstico da ATS/ERS mas não tinham confirmação histológica, pois pareceu-nos que a sua não inclusão retiraria representatividade à amostra.

Os estudos sobre a associação do sistema HLA e a sarcoidose privilegiaram inicialmente a classe I deste complexo. As várias

I alleles and susceptibility to sarcoidosis. The most commonly described is the link with HLA-B8 in Caucasian populations<sup>8-13</sup>. Further associations have been revealed, including those with HLA-A1, HLA-B13, HLA-B15, HLA-B22, HLA-B35, HLA-Cw7 and the association between Afro-Americans and HLA-B7<sup>10,11,13,14,15,16,17</sup>. HLA-B8 is also related to an acute presentation with spontaneous remission<sup>16</sup>. HLA class II has received a greater focus in recent years. As this class involves the T CD4+ lymphocytes in the antigen presentation it seems that its association with sarcoidosis is more probable. Several authors claim that the associations found with HLA class I could be the result of linkage disequilibrium with class II alleles related with sarcoidosis<sup>4</sup>. However HLA class I has been the subject of more recent studies, applying polymerase chain reaction techniques, which have described significant connections with HLA-B\*07 and HLA-B\*08 as independent risk factors for sarcoidosis susceptibility<sup>18</sup>. In addition, the HLA-B\*07, HLA-B\*08 and

**O HLA-B8 foi relacionado com a apresentação aguda, de curta duração e de regressão espontânea**

publicações existentes na literatura internacional referem algumas associações entre alelos desta classe e a susceptibilidade à sarcoidose, sendo a mais comum a ligação com o HLA-B8 em populações caucasianas<sup>8-13</sup>. Estão descritas outras associações, nomeadamente com o HLA-A1, HLA-B13, HLA-B15, HLA-B22, HLA-B35, HLA-Cw7 e nos afro-americanos com o HLA-B7<sup>10,11,13,14,15,16,17</sup>. Por outro lado, o HLA-B8 foi relacionado com a apresentação aguda, de curta duração e de regressão espontânea<sup>16</sup>. Mais recentemente, foi dada uma maior ênfase à classe II do HLA, por esta envolver os linfócitos T CD4+ na apresentação do antígeno, sendo assim mais provável a sua relação com a sarcoidose. Segundo alguns autores, as associações encontradas com a classe I do HLA poderiam ser resultantes de desequilíbrios de ligação com genes da classe II, de maior relevância<sup>4</sup>. No entanto, mais recentemente, a classe I do HLA tem sido objecto de novos estudos, agora com métodos de biologia molecular, estando descritas conexões significativas com o HLA-B\*07 e HLA-B\*08, apresentando-se estes como factores de risco independentes para a susceptibilidade na sarcoidose<sup>18</sup>. Por outro lado, a combinação alélica HLA-B\*07, HLA-B\*08 e HLA-DRB1\*15 mostrou uma associação significativa com a cronicidade da doença<sup>18</sup>. Para além destes alelos, o HLA-A\*01, HLA-B\*08 e HLA-C\*03 mostraram influência no prognóstico ao associarem-se de forma significativa à regressão da doença<sup>7,19</sup>. Estes resultados sugerem que a classe I do HLA desempenha uma função importante conjuntamente com a classe II na susceptibilidade e prognóstico da sarcoidose<sup>4,7</sup>. Neste estudo observou-se igualmente um aumento significativo da

HLA-DRB1\*15 allelic combination shows a significant association with the disease's chronic state<sup>18</sup>, while the alleles HLA-A\*01, HLA-B\*08 and HLA-C\*03 has been significantly related to disease remission<sup>7,19</sup>. These results suggest that HLA class I plays a substantial role in conjunction with class II in sarcoidosis susceptibility and prognosis<sup>4,7</sup>. Our study also showed a significant increase in HLA-B\*08 frequency. Despite this significance not remaining after multiple comparison correction, the prior description of this allele's association with susceptibility to sarcoidosis in several studies leads us to value this result.

As already stated, HLA class II has recently come into focus as it seems to have a stronger relationship with the pathophysiology of sarcoidosis. Within class II, the most frequently studied antigens have been HLA-DR. Some variation in the associations has been found, particularly related to the geographic origin of the patients. Significant association with susceptibility to sarcoidosis was initially described in relation to the HLA-DR2, DR5, DR6, DR8, DR9 antigens and after with the DRB1\* alleles<sup>17,20,21,22,23</sup>. Among the studies which revealed an association with the HLA-DRB1\* locus, a great variation also has been found and the alleles DRB1\*03, DRB1\*08, DRB1\*11, DRB1\*12, DRB1\*14 and DRB1\*15 have been described<sup>14,19,24,25,26</sup>. Further, the association of the HLA-DPB1 locus alleles with susceptibility to sarcoidosis was also described<sup>23</sup>. In their turn, the studies undertaken into the HLA-DQB1 locus show a significant association with some of its alleles, particu-

frequência do HLA-B\*08. Embora esta significância não se mantenha após a correção do p para as múltiplas comparações, a persistência da associação deste alelo com a susceptibilidade à sarcoidose em vários estudos publicados leva-nos a valorizar esta associação. Como foi referido, a classe II do HLA tem sido recentemente objecto de maior atenção, dado aparentar uma maior relação com a fisiopatologia da sarcoidose. Dentro da classe II, os antígenos HLA-DR têm sido os mais frequentemente estudados. Tem-se observado alguma variabilidade nas associações encontradas, nomeadamente com a origem geográfica dos doentes. A associação significativa com a susceptibilidade à sarcoidose foi descrita inicialmente em relação aos antígenos HLA-DR2, DR5, DR6, DR8, DR9 e, posteriormente, a alelos DRB1\*17,20,21,22,23.

Dentro dos vários estudos que encontraram associação com o locus HLA-DRB1\*, verificou-se igualmente uma grande variação nos alelos: DRB1\*03, DRB1\*08, DRB1\*11, DRB1\*12, DRB1\*14, DRB1\*15<sup>14,19,24,25,26</sup>. Está também descrita a associação de alelos do locus HLA-DPB1 com a susceptibilidade para a ocorrência de sarcoidose<sup>23</sup>. Por sua vez, os estudos efectuados com o locus HLA-DQB1 revelaram uma associação significativa com alguns dos seus alelos, nomeadamente em populações afro-americanas<sup>27</sup>. Neste estudo, encontramos também uma associação da susceptibilidade com os alelos HLA-DRB1\*03 e DRB1\*12, o que parece estar de acordo com a influência do locus HLA-DRB1\* na susceptibilidade para a ocorrência da sarcoidose. Embora a relação não se mantenha significativa após correção estatística para as múltiplas comparações, valorizámos igualmente este resultado, dados os resultados idênticos

larly in Afro-American populations<sup>27</sup>. We also found an association between susceptibility and the HLA-DRB1\*03 and DRB1\*12 alleles, which seems to agree with the influence of the HLA-DRB1\* locus in susceptibility to sarcoidosis. While these relations did not retain statistical significance after correction for multiple comparisons, we emphasise this result, given the identical results described in the literature. Further, alleles which seem to confer protection, including DRB1\*03, DRB1\*08, DRB1\*11, DRB1\*12, DRB1\*14, DRB1\*15, DQB1\*0202, DQB1\*0301, DQB1\*0501, DQB1\*0601, DQB1\*0602 and DQB1\*0203<sup>14,19,24,25,28</sup> are described in the literature. We found that the DRB1\*04, DRB1\*07 and DRB1\*08 alleles were lower in sarcoidosis patients than they were in the controls, although these results were not statistically significant after multiple comparison correction.

Associations with different clinical presentations are also described, particularly between Löfgren's syndrome and DQB1\*0201 and DRB1\*03<sup>28,29,30</sup>. We verified similar results, given the statistically significant relationship found for the DQB1\*02 and DRB1\*03 alleles.

Lung function analysis in sarcoidosis has not come under scrutiny in HLA studies. A significant association between DRB1\*15 allele with restrictive pattern and decreased diffusion capacity has been found, but only the first association maintains statistical significance after multiple comparison correction. These results could suggest an association between this allele and disease severity, since these functional abnormalities are usually related to a more severe form of the disease.

---

**A classe II do HLA tem sido recentemente objecto de maior atenção, dado aparentar uma maior relação com a fisiopatologia da sarcoidose**

descritos na literatura. Por outro lado, encontram-se descritas na literatura alelos que parecem conferir protecção como os DRB1\*03, DRB1\*08, DRB1\*11, DRB1\*12, DRB1\*14, DRB1\*15, DQB1\*0202, DQB1\*0301, DQB1\*0501, DQB1\*0601, DQB1\*0602 e DQB1\*0203<sup>14,19,24,25,28</sup>. No presente estudo, os alelos DRB1\*04, DRB1\*07 e DRB1\*08 apresentaram-se diminuídos nos doentes com sarcoidose em relação aos controlos, resultados esses que no entanto não foram significativos após a correcção estatística das múltiplas comparações.

Estão igualmente descritas associações com diferentes apresentações clínicas, nomeadamente entre a síndrome de Löfgren e DQB1\*0201 e o DRB1\*03<sup>28,29,30</sup>. Estes resultados são coincidentes com aqueles por nós obtidos, dada a relação estatisticamente significativa encontrada para os alelos DQB1\*02 e DRB1\*03.

A avaliação funcional respiratória não tem sido objecto de análise nos estudos referentes ao HLA no contexto da sarcoidose. A série de doentes estudada revelou uma relação significativa do alelo DRB1\*15 com a síndrome restritiva e com a diminuição da transferência alveolocapilar, embora em relação a este último não mantenha a significância quando ajustado para as múltiplas comparações. Estes resultados poderão sugerir uma associação deste alelo com a gravidade da doença, dado as alterações funcionais com que se correlacionou serem geralmente apresentados pelos doentes com doença mais severa.

Noutros estudos sobre eventuais associações com a gravidade da doença definida pelos estadios radiológicos, foi encontrada uma associação significativa com o DQB1\*0201 e estágio radiológico I e entre o alelo

Other studies concerning the possible associations with disease severity as defined by radiology staging showed a significant association between DQB1\*0201 and stage I and between the DQB1\*0602 allele and more advanced radiology stages<sup>26,28</sup>. We found no evident relationship between any allele and radiology stages. While DRB1\*11 allele is increased in stages III and IV, it does not attain statistical significance after multiple comparison correction.

The sarcoidosis outcome has also been related to some components of the HLA system. The progression to chronic state was described as being associated with HLA-DR2, DR5, DR14 and DR15 antigens and the DRB1\*15<sup>14,17,22,31</sup> allele. Additionally, limited disease was related to HLA-DR2 and DR17<sup>17,31</sup>. We found an association between chronic state and the HLA-DRB1\*04 allele, which, however, did not attain statistical significance after multiple comparison correction.

The cytokines released by the macrophages and T lymphocytes play a vital role in the pathogenesis of sarcoidosis, particularly in inflammation and granuloma formation. Accordingly, polymorphisms in the genes which codify these cytokines can be determinants of susceptibility, degree of severity or disease progression<sup>4,32</sup>. We included the evaluation of TNF- $\alpha$  genotypes in our study given the importance of this cytokine in the inflammatory and immunology mechanisms, specifically in the recruitment of mononuclear cells and the formation and maintenance of granulomas and as they are equally encompassed in the MHC complex.

The TNF complex is situated in the MHC region between the HLA-B locus and the



DQB1\*0602 e estádios radiológicos mais avançados<sup>26,28</sup>. Neste estudo não encontramos uma associação evidente entre nenhum alelo e os estádios radiológicos. Pese embora o alelo DRB1\*11 estar aumentado nos estádios III e IV, não adquiriu a significância estatística quando corrigido. Também o tipo de evolução parece estar relacionado com alguns dos componentes do sistema HLA, tendo a evolução para a cronicidade sido relacionada com os antígenos HLA-DR2, DR5, DR14, DR15 e o alelo DRB1\*15<sup>14,17,22,31</sup>. Por outro lado, a doença limitada foi relacionada com o HLA-DR2 e o DR17<sup>17,31</sup>. Este estudo encontrou uma associação entre a cronicidade e o alelo HLA-DRB1\*04, que, no entanto, não apresentou significância quando corrigida.

As citocinas libertadas pelos macrófagos e linfócitos T apresentam um papel fundamental na patogénese da sarcoidose, nomeadamente na inflamação e formação do granuloma. Por este motivo, variações nos genes que codificam estas citocinas poderão ser determinantes na susceptibilidade, grau de gravidade ou evolução desta doença<sup>4,32</sup>. Neste estudo incluímos a avaliação dos polimorfismos genéticos do TNF- $\alpha$ , dada a importância desta citocina no mecanismo inflamatório e imunológico, nomeadamente no recrutamento das células mononucleares e na formação e manutenção dos granulomas e por se encontrar igualmente englobado no complexo MHC. O complexo TNF encontra-se localizado na região MHC, entre o locus HLA-B e a região de alguns genes de factores de complemento, sendo constituído pelo TNF- $\alpha$  e pela linfotóxina  $\beta$  (previamente designada TNF- $\beta$ )<sup>33</sup>. Mantém-se no entanto em discussão se os polimorfismos genéticos associados ao TNF serão funcionais ou corresponderão a desequilí-

region of several complement factor genes. It is made up of TNF- $\alpha$  and lymphotoxin  $\beta$  (formerly known as TNF- $\beta$ )<sup>33</sup>. It is still a topic of debate if the genetic polymorphisms associated with TNF are functional or correspond to linkage disequilibrium with other areas of the HLA complex<sup>4</sup>. Further, the association between the genotypes found and the degree of TNF release is still unknown, at both the serum and BAL level<sup>34</sup>.

Previous studies describe associations between TNF polymorphisms in terms of susceptibility, degree of severity, progression and with organ involvement, particularly cardiac. The TNF- $\alpha$ -857T and TNF308\*A alleles show a significant increase in sarcoidosis patients<sup>35-37</sup>. Associations between the TNFA\*2 alleles, particularly the TNF308\*A, and Löfgren's syndrome<sup>30,35,36,38,39,40</sup> were also found. On the other hand, the haplotype 2 of the -875T allele is significantly associated to stage I and disease remission, while the haplotype 4 is associated to stages II-IV and unfavourable disease outcome<sup>36</sup>. A relationship between the TNF- $\beta$  TNFB\*1 allele and chronic disease was also seen in a study that demonstrated the production of both the TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  in this polymorphism, which may indicate its functional role<sup>41</sup>. An association between cardiac disease and the TNF A\*2 allele in linkage disequilibrium with the HLA-DQB1\*0601 allele was seen in a Japanese population<sup>42</sup>. We only found an association between the A/A (-308\*A) genotype associated to a high production of TNF- $\alpha$  and the patients with EN in our population. We saw no significant relations in terms of susceptibility, other types of clini-

**As citocinas libertadas pelos macrófagos e linfócitos T apresentam um papel fundamental na patogénese da sarcoidose**

brios de ligação com outras zonas do complexo HLA<sup>4</sup>. Por outro lado, a correlação entre os polimorfismos encontrados e o grau de libertação de TNF permanece em dúvida, quer a nível sérico quer a nível do LBA<sup>34</sup>. Estudos efectuados relataram associações entre polimorfismos do TNF, quer com a susceptibilidade, o grau de gravidade, a evolução, quer com o envolvimento orgânico, nomeadamente o cardíaco. Os alelos TNF- $\alpha$ -857T e TNF308\*A apresentaram um aumento significativo em doentes com sarcoidose<sup>35-37</sup>. Foram igualmente encontradas associações entre os alelos TNFA\*2, nomeadamente o TNF308\*A, e a síndrome de Löfgren<sup>30,35,36,38,39,40</sup>. Por outro lado, o haplótipo 2 do alelo -875T associou-se significativamente ao estágio I e regressão da doença, enquanto o haplótipo 4 se associou aos estádios II-IV e evolução desfavorável da doença<sup>36</sup>. Foi também observada a relação entre o alelo TNFB\*1 do TNF- $\beta$  e o prolongamento da doença, tendo neste trabalho sido verificado a produção quer de TNF- $\alpha$  quer TNF- $\beta$  neste polimorfismo, o que poderá significar um papel funcional deste<sup>41</sup>. Foi igualmente descrita na população japonesa a associação entre doença cardíaca e o alelo TNF A\*2, em desequilíbrio de ligação com o alelo HLA-DQB1\*0601<sup>42</sup>. Na presente série de doentes, apenas encontramos associação entre o genótipo A/A (-308\*A), associado a alta produção de TNF- $\alpha$ , e os doentes que apresentaram EN, não tendo sido observada qualquer relação, nomeadamente com a susceptibilidade, outros tipos de apresentação clínica, grau de severidade e evolução.

Pensamos constituir este estudo mais uma evidência de que os polimorfismos genéticos a nível do sistema HLA poderão influenciar a susceptibilidade à doença, a sua ex-

cal presentation, degree of severity or outcome.

The results revealed by this study add evidence to the influence of HLA polymorphisms on susceptibility, clinical expression and outcome in sarcoidosis. However further studies with larger sample populations and a greater association of the allelic differences found in different populations are necessary to know the exact meaning of HLA polymorphisms in this disease.

**Os polimorfismos genéticos a nível do sistema HLA poderão influenciar a susceptibilidade à doença, a sua expressão clínica ou ainda a evolução**

pressão clínica ou ainda a evolução. São, no entanto, necessários mais estudos, com amostras contendo um maior número de doentes e uma maior associação das diferenças alélicas encontradas em diferentes populações para uma melhor precisão da sua influência.

### Bibliografia / Bibliography

1. Hunninghake GW, Costabel U, Ando M. ATS/ERS/WASOG Statement on Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:736-55.
2. Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2153-65.
3. Baughman RP, Lower EE, du Bois R. Sarcoidosis. *Lancet* 2003; 361: 1111.
4. Iannuzzi MC, Rybicki BA. Genetics of sarcoidosis; candidate genes and genome scans. *Proc Am Thorac Soc* 2007; (4):108-16.
5. Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM *et al.* Familial aggregation of sarcoidosis. A case control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 2085.
6. Klein J, Sato A. The HLA System. *N Engl J Med*, 2000; 343, 10: 702-709
7. Rybicki BA, Iannuzzi MC. Sarcoidosis and human leukocyte antigen class I and II genes. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 665-666.
8. Brewerton D, Cockburn C, James D, *et al.* HLA antigens in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 1977 ; 27 : 227-229.
9. Olenchock S, Heise E, Marz J, *et al.* HLA-B8 in sarcoidosis. *Ann Allergy* 1981 ; 47 : 151-153.
10. Lenhart K, Kolek V, Bartova A. HLA antigens associated with sarcoidosis. *Dis Markers* 1990 ; 8 : 23-29.
11. Dubaniewicz A, Szczerkowska Z. HLA-A,B,C antigens in pulmonary sarcoidosis in Polish population. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999; 47 (1): 55-9.
12. Pasturenzi L, Martinetti M, Cuccia M. HLA class I, II, III polymorphism in Italian patients with sarcoidosis. *Chest* 1993 Oct; 104 (4): 1170-5.
13. Martinetti M, Tinelli C, Kolek V, *et al.* 'The sarcoidosis map': a joint survey of clinical and immunogenetic findings in two European countries. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:557-64.
14. Sharma S, Balamurugan A, Pandey R, *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: 225-31.
15. Dubaniewicz A, Szczerkowska Z, Hoppe A. Comparative analysis of HLA class I antigens in pulmonary sarcoidosis and tuberculosis in the same ethnic group. *Mayo Clin Proc* 2003; 78(4):436-42.
16. McIntyre J, Mckee K, Loadholt C, *et al.* Increased HLA-B7 antigen frequency in South Caroline blacks in association with sarcoidosis. *Transplant Proc* 1977; 9: 173-176.
17. Rutherford RM, Brutshe MH, Kearns M, *et al.* HLA-DR2 predicts susceptibility and disease chronicity in Irish sarcoidosis patients. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21(3):191-8.
18. Smith M, Turton C, Mitchell D, *et al.* Association of HLA-B8 with spontaneous resolution in sarcoidosis. *Thorax* 1981; 36: 296-298.
19. Grunewald J, Eklund A, Olerup O. Human leukocyte antigen class I alleles and the disease course in sarcoidosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 696-702.
20. Ishihara M, Inoko H, Suzuki K, *et al.* HLA class II genotyping of sarcoidosis patients in Hokkaido by PCR-RFLP. *Jpn J Ophthalmol* 1996; 40: 540-3.
21. Ishihara M, Ishida T, Inoko H, *et al.* HLA serological and class II genotyping in sarcoidosis patients in Japan. *Jpn J Ophthalmol* 1996; 40: 86-94.
22. Nowack D, Goebel KM. Genetic aspects of sarcoidosis. Class II histocompatibility antigens and a family study. *Arch Intern Med* 1987; 147: 481-3.
23. Rossman MD, Thomson B, Frederick M, *et al.* HLA-DRB1\*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 720-35.
24. Iannuzzi M, Maliarik M, Poisson L, *et al.* Sarcoidosis susceptibility and resistance HLA-DQB1 alleles in African Americans. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1225-31.
25. Grutters J, Sato H, Welsh K, *et al.* *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29:S59-S62.
26. Voorter CE, Drent M, Van den Berger-Loonen EM. Severe pulmonary sarcoidosis is strongly associated with the haplotype HLA-DQB1\*0602-DRB1\*150101. *Hum Immunol* 2005; 66(7):826-35.
27. Rybicki BA, Maliarik MJ, Poisson LM. The major histocompatibility complex gene region and sarcoidosis

- susceptibility in African Americans. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 444-449.
28. Sato H, Grutters J, Pantelidis P, *et al.* HLA – DQB1\*0201: a marker for good prognosis in british and dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27:406-11.
29. Grutters JC, Ruven HJT, Sato H, *et al.* MHC haplotype analysis in Dutch sarcoidosis patients presenting with Löfgren's syndrome. *In: Grutters JC (Ed.). Genetic polymorphisms and phenotypes in sarcoidosis.* Utrecht, Thesis University Utrecht, 2003: 85-96.
30. Mrazek F, Holla LI, Hutyrova B, *et al.* Association of tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha and HLA-DRB1 gene polymorphisms with Lofgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2005; 65(2):163-71.
31. Berlin M, Fogdell-Hahn A, Olerup O, *et al.* HLA-DR predicts the prognosis in Scandinavian patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1601-5.
32. Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, *et al.* Analysis of IL-6 and IL1A gene polymorphisms in UK and Dutch patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vas Diffuse Lung Dis* 2003; 20(1):20-7.
33. Spagnolo P, du Bois RM. Genetics of sarcoidosis. *Clinics in Dermatology* 2007; 25:242-9.
34. Somoskovi A, Zissel G, Seitzer U, *et al.* Polymorphisms at position – 308 in the promoter region of the TNF-alpha and in the first intron of the TNF-beta genes and spontaneous and lipopolysaccharide-induced TNF-alpha release in sarcoidosis. *Cytokine* 1999; 11 (11): 882-887.
35. Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, *et al.* Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor-857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1119-1124.
36. Grutters JC, Ruven HJT, Sato H, *et al.* TNF promotor haplotypes associate with clinical phenotypes and prognosis in sarcoidosis. *In: Grutters JC (Ed.). Genetic polymorphisms and phenotypes in sarcoidosis.* Utrecht, Thesis University Utrecht; 2003: 49-66.
37. Mrazek F, Holla LI, Hutyrova B, Znojil V, Vasku A, Kolek V, Welsh KI, Vacha J, du Bois RM, Petrek M. Association of tumor necrosis factor- $\alpha$ , lymphotoxin- $\alpha$  and DRB1 gene polymorphisms with Löfgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2005; 65:163-717
38. Seitzer U, Swider C, Stuber F, *et al.* Tumour necrosis factor alpha promotor gene polymorphism in sarcoidosis. *Cytokine* 1997; 9: 787-90.
39. Martinetti M, Luisetti M, Cuccia M. HLA and sarcoidosis: new pathogenic insights. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2002; 19.
40. Labunski S, Posern G, Ludwig S, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha promoter polymorphism in erythema nodosum. *Acta Derm Venereol* 2001; 81(1): 18-21.
41. Yamaguchi E, Itoh A, Hizawa N, *et al.* The gene polymorphism of tumour necrosis factor-beta, but not that of tumour necrosis factor-alpha, is associated with prognosis of sarcoidosis. *Chest* 2001; 119 (3): 753-61.
42. Takashige N, Naruse TK, Matsumori A, *et al.* Genetic polymorphisms at tumour necrosis factor loci (TNFA and TNFB) in cardiac sarcoidosis. *Tissue Antigens* 1999; 54(2):191-3.