

Expressão de marcadores inflamatórios na patologia intersticial pulmonar

Autor: Brigitte Margarete de Jesus Ferreira

Afiliação: Centro Pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Endereço: Serviço de Pneumologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, 3000-075
Coimbra

E-mail: brigitteferreira@gmail.com

Orientador: Prof. Doutor Carlos Manuel da Silva Robalo Cordeiro

Co-orientador: Dr. Tiago Manuel Pombo Alfaro

Abril 2011

Agradecimentos:

Aos:

Prof. Doutor Carlos Manuel da Silva Robalo Cordeiro

Prof. Doutora Henriqueta Alexandra Mendes Breda Lobo Coimbra Silva

Dr. Luís Alcides Mesquita Nogueira

Por todo o incentivo, apoio, instrução e disponibilidade que sempre mostraram para a realização deste trabalho.

Em especial ao Dr. Tiago Manuel Pombo Alfaro pelo empenho, dedicação, paciência, múltiplas leituras e ensinamentos...

Maria dos Prazeres de Jesus Grilo, minha mãe, e António Ferreira Coelho, meu pai, por tudo, pelo possível e impossível, que por mim fizeram, por tudo aquilo que as palavras não dizem.

Bruno Joel de Jesus Ferreira, meu irmão, Judite Margarida Pereira Lima, minha cunhada e à minha pequenina, mas enorme inspiração, sobrinha e afilhada Leonor.

À minha restante família que acreditou...

Aos meus amigos...

À música e à natureza.



Índice

Abreviaturas	5
Resumo.....	8
Palavras-chave.....	9
Introdução.....	10
Doenças pulmonares intersticiais (DPI) - Introdução	10
Classificação.....	11
Porquê biomarcadores?	14
Sobre os biomarcadores.....	15
Onde pesquisar os biomarcadores?	16
Que biomarcadores?.....	17
Biomarcadores ligados a proteínas específicas do epitélio pulmonar	17
Citocinas e outros parâmetros serológicos	17
Uma breve nota referente ao LBA	18
Sarcoidose	20
Dados históricos e epidemiológicos	20
Clínica	20
LBA na sarcoidose	21
Diagnóstico.....	22
A resposta imunológica.....	23
Resposta imunológica no LBA.....	27
Actividade e prognóstico.....	29
A investigação de biomarcadores na sarcoidose	30
Considerações genéticas.....	31
Biomarcadores de actividade e prognóstico	31
Quimiocinas na sarcoidose:.....	33
Proteínas do epitélio pulmonar.....	33
Outros biomarcadores.....	34
Terapêutica na sarcoidose	36
Fibrose Pulmonar idiopática.....	38
Dados epidemiológicos	38
Clínica	38
Diagnóstico.....	39
Recomendações terapêuticas	39
Padrão histológico, dificuldades no diagnóstico diferencial e prognóstico.....	40

Investigação da patogenia	41
FPI vs DTC.....	43
Histopatologia da FPI.....	44
Fisiopatologia da EA-FPI e relação EA-FPI vs ARDS	45
Actividade e seguimento da FPI.....	48
Biomarcadores de actividade.....	48
Biomarcadores de diagnóstico diferencial, seguimento e prognóstico.....	48
Outros biomarcadores: CK19, Ca19-9, SLX.....	53
Outros biomarcadores: citocinas	54
Análise simultânea de biomarcadores	55
Doenças pulmonares ocupacionais.....	58
Introdução.....	58
Pneumonite de hipersensibilidade	60
Etiologia	60
Epidemiologia	60
Patogenia	60
Biomarcadores da PH.....	61
Pneumoconioses	63
Epidemiologia	63
Fisiopatologia	63
Beriliose	64
Biomarcadores nas pneumoconioses.....	65
Biomarcadores noutras patologias do interstício pulmonar	68
Pneumonite induzida por fármacos	68
Pneumonite induzida por radiação	69
Contributo pessoal: trabalho de investigação.....	71
Expressão de perfis de marcadores inflamatórios na patologia intersticial pulmonar.....	71
Objectivos.....	71
Métodos.....	71
Recrutamento de doentes.....	73
Estudo estatístico.....	74
Resultados	75
Discussão.....	80
Discussão/Conclusão.....	83
Referências:.....	89

Abreviaturas

Apresento aqui a lista de abreviaturas utilizadas. Optei por utilizar abreviaturas em inglês quando assim são utilizadas na prática clínica e as restantes em português.

ACIF – Airway-centered interstitial fibrosis – fibrose intersticial centrada nas vias aéreas.

AIP - Acute interstitial pneumonia - pneumonia intersticial aguda

ALAT - Asociación Latinoamericana de Tórax

APC - Antigen-presenting cell - célula apresentadora de antigénio

ARDS - Síndrome de dificuldade respiratória aguda

ATS / ERS - American Thoracic Society/European Respiratory Society

BOOP – Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia - bronquiolite obliterante com pneumonia em organização (=OP)

Ca19-9 - Antígeno hidrato de carbono Sialyl Lewis (a)

CC16 - Proteína 16 das células de Clara

CK19 - Fragmento de citoqueratina 19

COP - Cryptogenic organizing pneumonia - pneumonia em organização criptogénica

CPT – Capacidade pulmonar total

CVF – Capacidade vital forçada

CXCL-11 - Quimiocina CXC 11

DCB – Doença crónica do berílio

DIP - Desquamative interstitial pneumonia - pneumonia intersticial descamativa

DLCO – Carbon Monoxide Diffusing Capacity - capacidade de difusão do monóxido de carbono

DPI - Doença pulmonar intersticial

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica

DTC – Doenças do tecido conjuntivo

EA-FPI – Exacerbação aguda da fibrose idiopática pulmonar

ECA -Enzima conversora da angiotensina

EGF - Epidermal growth factor – factor de crescimentos epidérmico

ES – Esclerose sistémica

FP – Fibrose pulmonar

FPI - Fibrose pulmonar idiopática

HLA - Human leukocyte antigen – antigénio leucocitário humano

ICAM - Inter-cellular adhesion molecule 1 - molécula de adesão intercelular 1

IGF – Insulin-like growth factor - factor de crescimento da insulina

IL - Interleucina

IL-R – Receptor da interleucina

INF - Interferão

ITAC - Interferão induzido pela célula T quimiotático

JRS - Japanese Respiratory Society

KL-6 - Krebs von den Lungen-6 (antigénio associado à mucina)

LAM - Linfangioleiomiomatose

LBA – Lavado broncoalveolar

LDH - Lactato desidrogenase

LIP - Lymphocytic interstitial pneumonia - pneumonia intersticial linfocítica

MCP-I - Proteína quimiotaxica do monócito I

MIP-I α - Proteína inflamatória dos monócitos I α

MMP – Metaloproteinase da matriz

MUC-I - Antigénio associado à mucina

NK - Natural killer



NSIP - Non-specific interstitial pneumonia – pneumonia intersticial pulmonar não específica

OP - Organizing pneumonia - pneumonia em organização (=BOOP)

PDGF - Platelet-derived growth factor - factor de crescimento derivado de plaquetas

PFR - Provas de função respiratórias

PH - Pneumonite de hipersensibilidade

PII - Pneumonias intersticiais idiopáticas

PLCH - Pulmonary Langerhans' cell histiocytosis - histiocitose pulmonar de células de Langerhans

RANTES - Regulated Activation Normal T Expressed and Secreted, também chamada CCL5

RBILD - Respiratory bronchiolitis associated interstitial lung disease - bronquiolite respiratória com doença intersticial pulmonar

SAA - Proteína sérica amilóide

sIL-2R - Receptor solúvel da interleucina 2

SLX - Antígeno hidrato de carbono Sialyl Lewis (x)

SP-A – Surfactant protein A - proteína associada ao surfactante A

SP-D – Surfactant protein D - proteína associada ao surfactante D

TCAR – Tomografia computadorizada de alta resolução

TCR - T cell receptor – receptor de células T

TGF- β - Transforming growth factor beta - factor de crescimento transformante beta

TIMP-1 – Tissue Inhibitor of Metalloproteinases - inibidor tecidual da metaloproteinases

TNF – Tumor necrosis factor- factor de necrose tumoral

TNFR – Tumor necrosis factor receptor - receptor do factor de necrose tumoral

UIP - Usual interstitial pneumonia – pneumonia intersticial usual

WASOG - World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders

Resumo

A patologia intersticial pulmonar engloba um grupo heterogéneo de entidades clínicas caracterizadas por lesão pulmonar e resposta imunoinflamatória parenquimatosa variável com progressão frequente para diversos graus de fibrose intersticial. Consequentemente, ocorre perda de função pulmonar, conduzindo muitas vezes a um prognóstico reservado.

A etiologia destas patologias pode estar relacionada com factores ambientais ou ocupacionais, patologia do tecido conjuntivo, ou ser desconhecida. Entre as entidades de etiologia desconhecida encontra-se a fibrose pulmonar idiopática, doença de mau prognóstico, com uma sobrevivência média de três anos.

A incidência deste grupo de patologias é de cerca de 10 a 30 casos por 100.000 habitantes, sendo responsável por morbilidade e mortalidade significativas.

Muitas pesquisas clínicas e histopatológicas trouxeram informação valiosa sobre aspectos diagnósticos das doenças intersticiais pulmonares. O aspecto clínico mais relevante nestas patologias é a sua progressão de inflamação para fibrose, lesão irreversível que conduz à falência respiratória. A prevenção desta progressão é o objectivo terapêutico fundamental. Para isso concorre a necessidade de um diagnóstico precoce e a compreensão dos mecanismos que conduzem ao processo de fibrose de forma a abrirmos as portas a uma actuação na fonte do problema. Muitas pesquisas têm sido feitas com este objectivo e alguns passos têm sido dados na compreensão dos mecanismos destas doenças. No âmbito desta patologia assistimos, nos últimos vinte anos, a uma vasto esforço de investigação científica que tem conduzido à compreensão das bases moleculares da doença, revelando uma variedade de excelentes novos biomarcadores biológicos que se apresentam promissores para a prática clínica quotidiana.

O objectivo é primariamente a classificação, o diagnóstico diferencial e uma melhor compreensão da patogénese da patologia intersticial pulmonar. E, por continuidade, a sua aplicação na prática médica, pela capacidade destes biomarcadores para detectar a doença,

avaliar o estado actual, monitorizar a sua progressão e apoiar o diagnóstico e as decisões terapêuticas.

Estes biomarcadores são geralmente mediadores inflamatórios e têm vindo a ser analisados principalmente no sangue e no lavado broncoalveolar, mas também noutros fluidos e tecidos.

Desta revisão, e pelos primeiros resultados do trabalho que temos em curso, concluímos que nos aproximamos da resolução do puzzle que conduzirá à compreensão dos mecanismos destas patologias e como tal biomarcadores como KL-6, SP-A, SP-D, MCP-1 e sIL-2R devem ser paralelamente explorados dado o potencial que foram revelando. E dada a complexidade da área, muito ainda ficará por explorar.

Palavras-chave

Doenças intersticiais pulmonares; fibrose pulmonar idiopática; sarcoidose; biomarcadores.



Introdução

Doenças pulmonares intersticiais (DPI) - Introdução

As DPI englobam várias patologias que afectam o parênquima pulmonar. São distúrbios diversos que se reúnem neste grupo pelas suas semelhanças clínicas, radiológicas, fisiológicas ou patológicas.

Têm sido difíceis de classificar pois caracterizam-se por envolvimento difuso do parênquima pulmonar quer como distúrbio primário quer como parte de um processo multiorgânico.

Um método útil classifica-as em dois grandes grupos: doenças associadas a inflamação e fibrose e doenças com reacção granulomatosa predominante na área intersticial ou vascular(1).

Em muitos casos o diagnóstico diferencial é de extrema importância dada a diferença de prognósticos entre patologias com manifestações clínicas e radiológicas semelhantes.

A característica clínica de alveolite fibrosante criptogénica está presente tanto na pneumonia intersticial não específica (NSIP - non-specific interstitial pneumonia) fibrótica como na fibrose pulmonar idiopática (FPI), no entanto o prognóstico difere muito (sobrevivência aos 5 anos de 10 a 15% na FPI e superior a 50% na NSIP fibrótica)(2).

As DPI são pouco frequentes. Representam cerca de 15% dos doentes observados na prática de Pneumologia(3, 4).

O presente trabalho centra-se na reunião e sistematização do conhecimento científico mais actual sobre os biomarcadores que possam ajudar a conhecer mais aprofundadamente a fisiopatologia destas doenças, bem como o explorar da sua potencial utilidade clínica. Incidimos principalmente na sarcoidose, FPI e em doenças pulmonares ocupacionais em virtude da sua frequência e mortalidade associada.

Classificação

A evolução na classificação destas doenças tem sido impulsionada por um conjunto de dados imagiológicos, epidemiológicos, clínicos, bioquímicos, genéticos e patológicos.

As DPI dividem-se de acordo com as recomendações da ATS/ERS (American Thoracic Society/European Respiratory Society) de 2001 em quatro categorias: as de causa conhecida, as pneumonias intersticiais idiopáticas (PII), as granulomatosas e outras. Esta classificação é baseada sobretudo na história clínica e avaliação histológica (Ilustração 1)(5).

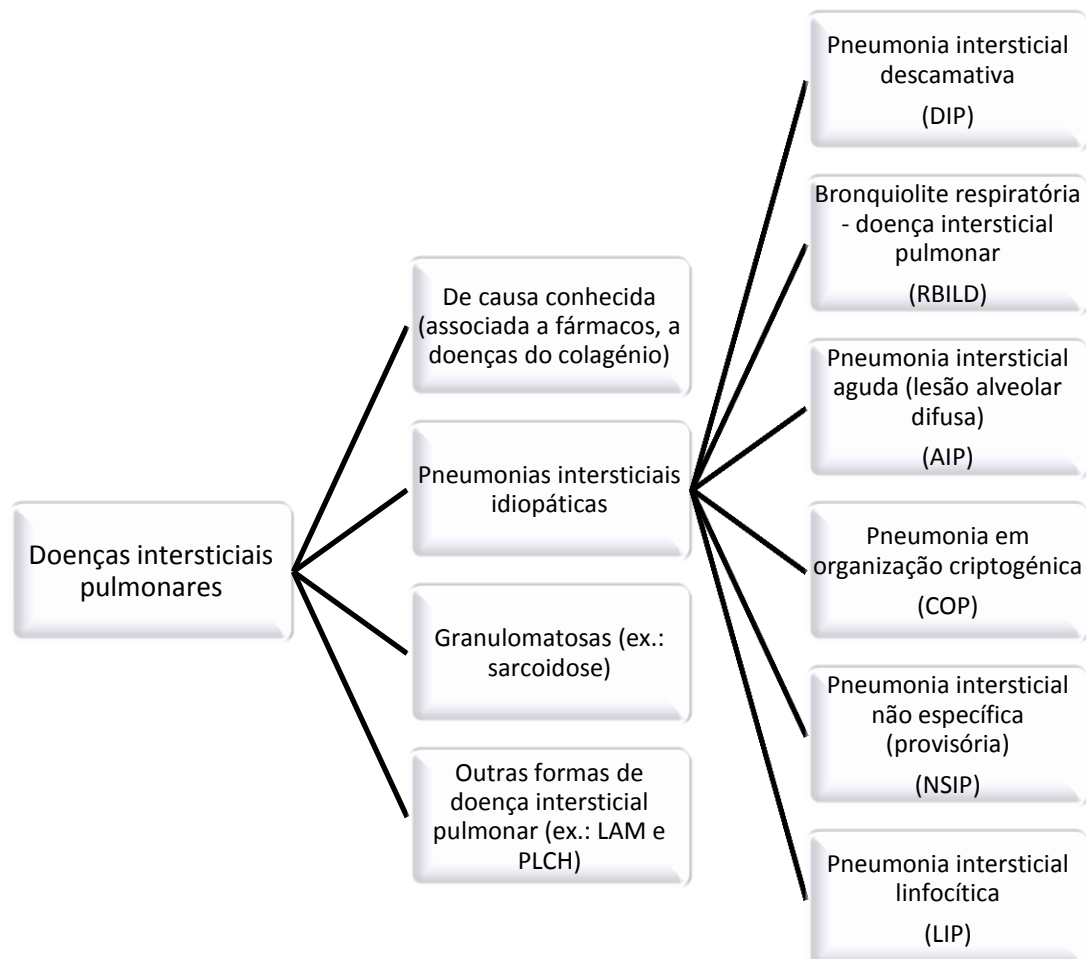


Ilustração 1 - Classificação da American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS).

Adaptado de(3)

A classificação tem sido alvo de controvérsias. A pneumonia intersticial usual (UIP – usual interstitial pneumonia), manifestação histológica da FPI, assemelha-se muitas vezes a outras pneumonias intersticiais pulmonares. Foi discutida a possibilidade de a pneumonia intersticial descamativa (DIP – desquamative interstitial pneumonia) ser precursora da UIP, no entanto dados recentes não suportam esta possibilidade(6). Por outro lado, a NSIP foi inicialmente incluída como uma entidade temporária e pouco definida. O padrão NSIP na biópsia já foi identificado em doenças do tecido conjuntivo, pneumonite de hipersensibilidade, pneumonite induzida por drogas, infecções e estados de imunodeficiência. Os restantes casos, sem associação clara, são consideradas as verdadeiras NSIP idiopáticas. Não se sabe se a NSIP e a UIP são a mesma entidade, no entanto, nos dias que correm acredita-se que sejam entidades distintas principalmente pela diferente resposta à terapêutica e mortalidade(3).

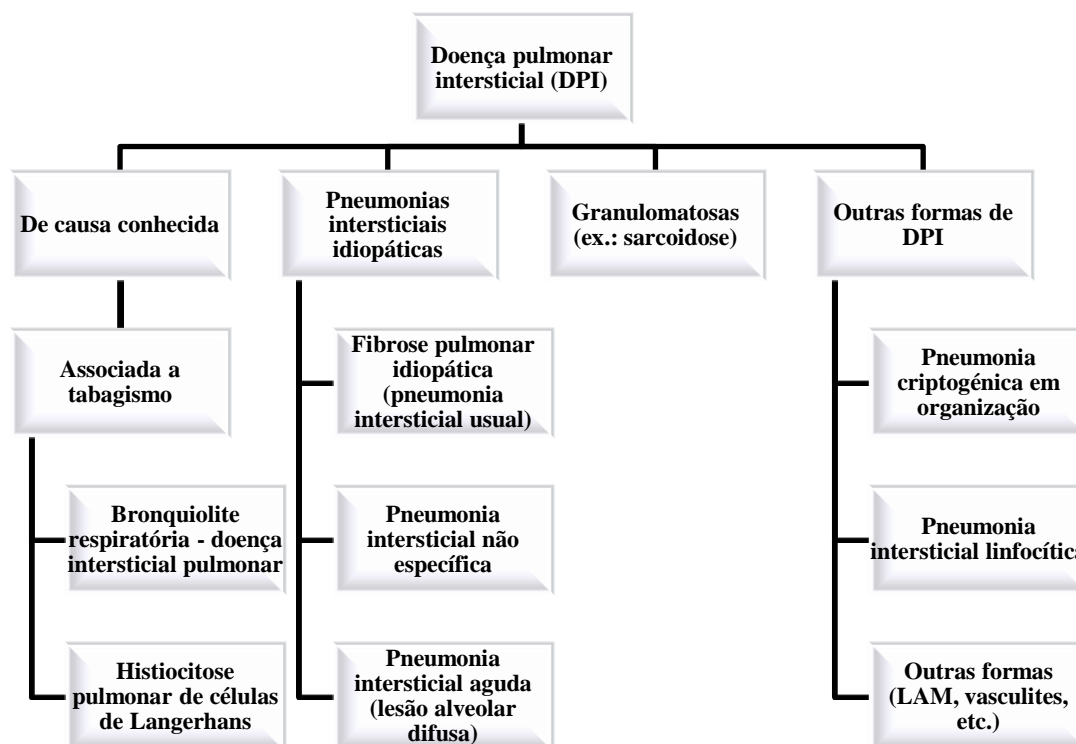


Ilustração 2 - Classificação das DPI da ATS/ERS modificada. Adaptado de(3).

Esta classificação encontra-se actualmente em processo de remodelação com o intuito de a tornar mais informativa no que respeita a etiologia, fisiopatologia e prognóstico. Nestas patologias, o elevado número de entidades, o desconhecimento da etiologia em várias delas, o facto de algumas se poderem manifestar sob a forma aguda ou crónica e de doenças incluídas na mesma categoria poderem ter ritmos variáveis de progressão dificultam sobremaneira a classificação(3).

Vários profissionais desta área, partindo do sistema de classificação da ATS / ERS (American Thoracic Society/European Respiratory Society), propõem alterações (Ilustração 2). Alguns membros das PII podem ser movidos para outras categorias. A DIP, a bronquiolite respiratória com doença intersticial pulmonar (RBILD - respiratory bronchiolitis associated interstitial lung disease) e a histiocitose pulmonar de células de Langerhans (PLCH - pulmonary Langerhans' cell histiocytosis) são apenas observadas em fumadores podendo ser movidas para a categoria de etiologia conhecida. A DIP é removida da classificação em favor da mais ampla e mais útil categoria de RBILD.

A pneumonia intersticial linfocítica (LIP - lymphocytic interstitial pneumonia) é uma doença linfoproliferativa podendo ser incluída na categoria “outras” ou na de etiologia conhecida (associada a HIV, linfomas, discrasia de células plasmáticas, etc.)

Histologicamente, a pneumonia em organização criptogénica (COP - cryptogenic organizing pneumonia) é um processo alveolar com a preservação da arquitectura do pulmão subjacente e deveria ser retirada desta classificação. No final dessa reorganização as PII contariam com pneumonia intersticial aguda (AIP - acute interstitial pneumonia), a FPI/UIP e a NSIP.

Considerando as entidades de etiologia desconhecida, entre as mais comuns, encontramos a sarcoidose, a FPI e a fibrose pulmonar (FP) associada às doenças do tecido conjuntivo. Estas patologias estão associadas a morbidade e mortalidade importantes.

O *Gold standard* no diagnóstico destas patologias, especialmente das PII, é uma combinação multidisciplinar dinâmica e integrada entre os especialistas em Pneumologia, Imagiologia e Anatomia patológica.

Porquê biomarcadores?

O termo “actividade” das DPI é interpretado segundo diversas perspectivas dependendo do autor. Para alguns expressa a inflamação e resposta à terapêutica, enquanto para outros a progressão.

Para avaliar a resposta à terapêutica dispomos de um bom método – TCAR (tomografia computadorizada de alta resolução)(7). Quanto à progressão é necessário encontrar um método que a avalie eficazmente. Os biomarcadores revelar-se-iam aqui fundamentais.

Mesmo nos distúrbios progressivos existe uma heterogeneidade significativa no que respeita ao risco de progressão. A TCAR revela-se eficaz na distinção entre as doenças individualmente, no entanto não prognostica a rapidez do eventual declínio na doença específica(7).

Outro importante objectivo na pesquisa dos biomarcadores é o de obter uma informação de prognóstico mais rigorosa num curto espaço de tempo. Actualmente dispomos de avaliações seriadas por TCAR e PFR (provas de função respiratória), estas com alto valor preditivo para a sobrevivência(8, 9). No entanto estes dois métodos requerem meses para que se possam tirar conclusões e por vezes o factor tempo é fundamental nestas patologias.

Sobre os biomarcadores

Um biomarcador é, em geral, uma substância que se usa como indicador de um estágio biológico. Pode ser medido e avaliado como um indicador de um processo biológico, patogénico ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica.

Os biomarcadores apresentam-se como ferramenta promissora para a prática clínica. A sua expressão nos pacientes com a doença revela-se diferente da expressão nos indivíduos normais. A partir deste estudo se estabelece a sensibilidade e especificidade de cada biomarcador.

Um biomarcador ideal deveria:

- aumentar na presença da doença (alta sensibilidade);
- não aumentar na ausência da doença (alta especificidade);
- adicionar informação sobre risco ou prognóstico;
- variar com a evolução da doença reflectindo o seu estágio;
- antecipar a evolução, ou seja, as alterações clínicas que ocorrerão antes que estas sejam evidentes;
- relacionar-se com o comprometimento e a extensão da doença;
- ser reprodutível;
- ser de determinação fácil e barata(7, 10, 11).

Estas características permitiriam distinguir claramente entre uma alteração significativa do biomarcador e o possível “ruído de fundo”. Os biomarcadores com elevada precisão mas pouco reprodutíveis podem-se categorizar numa escala semi-quantitativa acrescentando assim reprodutibilidade.

Por outro lado as características necessárias para um biomarcador relacionam-se com a sua função em particular. Se pretendemos que seja usado para diagnóstico deve ser sensível e



específico(7, 12). Se pretende ser um biomarcador de prognóstico deve estar normal se a doença estiver estabilizada(7). A extensão da doença e as suas consequências não fazem parte dos requisitos dos biomarcadores nas DPI. Para isso os clínicos usam a TCAR e as PFR.

Em conclusão, a necessidade clínica de um biomarcador nas DPI que indique a presença ou ausência da doença e diagnóstico histológico específico tem um valor provavelmente questionável. Por outro lado, a necessidade clínica torna-se inestimável no que respeita à previsão da linha de base e do ritmo de progressão e numa previsão precoce de resposta à terapêutica (baseado numa rápida variação do biomarcador em resposta ao tratamento bem sucedido). Isso permitirá que a resposta aos anti-inflamatórios ou outros tratamentos seja rapidamente avaliada sem a necessidade de um tempo de seguimento prolongado.

Onde pesquisar os biomarcadores?

O lavado broncoalveolar (LBA) representa o meio mais comum de estudo das proteínas segregadas pelo epitélio pulmonar. Nos últimos vinte anos, estudos pioneiros(7, 13) mostraram a presença de pequenas quantidades dessas proteínas na circulação sanguínea, que se detectaram utilizando técnicas de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), observando-se variações significativas dos seus níveis no soro de pacientes com diferentes DPI.

Como estas proteínas são principalmente segregadas no trato respiratório, a sua ocorrência no sangue pode ser explicada por vários mecanismos hipotéticos incluindo(7, 14):

- aumento da permeabilidade dos vasos do pulmão e destruição da barreira alvéolo-capilar por lesão da membrana basal com transferência dessas proteínas para o espaço vascular;
- aumento da produção pelos pneumócitos tipo II por hiperplasia difusa e
- diminuição das taxas de depuração sanguínea (ex. doentes com insuficiência renal).

O plasma, a urina e o ar exalado têm sido outros produtos biológicos onde podem ser estudados biomarcadores de patologia respiratória.

Que biomarcadores?

Têm sido pesquisados no âmbito das doenças do interstício vários tipos de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcadores ligados a proteínas específicas do epitélio pulmonar

- As proteínas associadas ao surfactante: SP-A e SP-D
- Antígenos associados à mucina: KL-6 (Krebs von den Lungen-6) / MUC-I (mucina).
- Proteínas das células de Clara: CC16
- Outros biomarcadores do epitélio pulmonar: CK 19 (fragmento de citoqueratina 19); Ca 19-9 (antígeno hidrato de carbono Sialyl Lewis (a)); SLX (antígeno hidrato de carbono Sialyl Lewis (x))

Citocinas e outros parâmetros serológicos

- Citocinas e quimiocinas: MCP-I (proteína quimiotática do monócito-I); MIP-1 α (proteína inflamatória dos monócitos); ITAC (interferão induzido pela célula T quimiotático) / CXCL-11 (quimiocina CXC-11); TNF (factor de necrose tumoral); TNFRs (receptores do factor de necrose tumoral).
- Enzimas anti-oxidantes e peptídeos do colagénio: glutatona; peptídeo do procolagénio tipo III.
- Biomarcadores da activação das células T: sIL-2R (receptor solúvel da interleucina 2)

- Biomarcadores da actividade dos macrófagos/monócitos: ECA (enzima de conversão da angiotensina); neopterina; β -glucuronidase; LDH (lactato desidrogenase).
- Metaloproteinases da matriz (MMPs).
- IGFBP (“insulin-like growth factor binding proteins”).
- SAA (proteína sérica amilóide)

Uma breve nota referente ao LBA

O LBA tem sido usado na avaliação de várias doenças do interstício pulmonar além de ser uma importante ferramenta de investigação. Uma das patologias em que tem sido muito utilizado é a sarcoidose. E muito tem contribuído para a compreensão desta patologia. Por exemplo: a reacção inflamatória da sarcoidose pode ser muito intensa no pulmão sem que ocorram alterações inflamatórias no sangue periférico(15, 16).

A utilização do LBA no seguimento clínico da doença intersticial pulmonar permanece controversa. Uma limitação tem sido as variações na forma como a amostra é obtida e manipulada. Esta representa a principal limitação à extrapolação do valor das análises do LBA para a realidade universal. Vários grupos desenvolveram recomendações para a obtenção e manipulação das amostras de LBA para que as amostras possam ser válidas(17, 18).

A aplicação de *guidelines* básicas na obtenção do LBA vai permitir dados analíticos mais confiáveis e precisos e a análise da amostra irá melhorar o seu valor diagnóstico e como ferramenta de pesquisa. É importante garantir que se recolha a amostra dos espaços aéreos alvo adequadamente e os componentes celulares e acelulares sejam processados e analisados correctamente.

A pesquisa de células malignas e a avaliação de subpopulações de linfócitos no LBA têm sido testes utilizados na prática clínica. Novos biomarcadores das DPI têm sido estudados para aplicabilidade clínica. São eles citocinas, enzimas, moléculas de adesão, produtos do colagénio e dos pneumócitos tipo II entre outras. Com o surgimento de novas técnicas para a análise da expressão de genes através da caracterização de ácidos nucleicos e perfis de proteínas em amostras biológicas complexas, o LBA torna-se ainda mais promissor no diagnóstico e seguimento de inúmeras patologias do interstício.

Além da proporção CD4/CD8, outros biomarcadores imunológicos têm sido utilizados para identificar células no LBA. Por exemplo, a presença de mais de 5% de células com marcação para CD1a é altamente sugestiva do diagnóstico de histiocitose pulmonar de células de Langerhans(19, 20).

Células malignas de leucemia ou linfoma também podem ser detectadas por imunocitoquímica(19, 21, 22).

Como tal, este meu trabalho pretende reunir as últimas pesquisas relativas aos biomarcadores inflamatórios referentes à sarcoidose, à FPI, e de forma mais genérica, doenças ocupacionais e outras DPI no sentido de realçar o seu potencial valor como ferramenta diagnóstica, de decisão terapêutica e de prognóstico.

Sarcoidose

Dados históricos e epidemiológicos

A primeira descrição do termo remonta a 1899 quando um dermatologista Norueguês, Caesar Boeck cunhou o termo para descrever nódulos na pele caracterizados por focos compactos e bem definidos de células epitelióides com grandes núcleos pálidos e por um pequeno número de células gigantes(23). A Sarcoidose é uma patologia crónica e multissistémica de causa indeterminada que ocorre em qualquer idade mas sobretudo antes dos 50 anos sendo o pico de incidência entre os 20 e os 39. A incidência mais elevada é encontrada no Norte da Europa variando de 5 a 40 casos por 100.000 habitantes(23).

Vários agentes foram identificados como possíveis causas, no entanto nenhum foi confirmado. Evidências crescentes indicam que o possível agente causal pode já ter sido eliminado do organismo quando a doença se desenvolve(23).

Clínica

O quadro clínico é variável. A apresentação aguda pode corresponder a uma forma auto-limitada de início abrupto - síndrome de Löfgren (eritema nodoso com adenopatia hilar bilateral e artrite dos tornozelos). A forma crónica tem geralmente um início insidioso e ocorre em cerca de 30% dos doentes mas a mortalidade é inferior a 5% e frequentemente ocorre por fibrose pulmonar progressiva(24).

Alguns sintomas constitucionais como astenia, febre e perda de peso ocorrem numa elevada percentagem de doentes.

Em mais de 90% dos casos há envolvimento pulmonar(23), sendo que muitas vezes envolve também órgãos extratorácicos como a pele, gânglios linfáticos, olhos, coração, fígado, baço, rins e sistema nervoso. A presença de granulomas não caseosos e acumulação de linfócitos T e macrófagos nos órgãos mencionados caracterizam a sarcoidose(7, 25).

Estão descritos cinco estádios de acometimento pulmonar nos doentes com sarcoidose(26). A radiografia do tórax tem fiabilidade apenas nos estádios I e II.

As PFR revelam uma diminuição da capacidade de difusão frequentemente acompanhada por disfunção ventilatória restritiva(24).

A biópsia pode ser obtida a partir de qualquer localização da doença e é recomendada a sua realização em dois locais diferentes. A evolução tecnológica com a ecografia endobrônquica veio facilitar a realização de biópsias ecoguiadas (nomeadamente a gânglios mediastínicos). A tomografia por emissão de positrões identifica locais ocultos de doença activa, mas não é recomendada como exame de rotina (sinaliza indiscriminadamente também outros estados inflamatórios ou neoplásicos)(23).

LBA na sarcoidose

A análise do LBA pode ser muito útil no diagnóstico diferencial. Alguns biomarcadores imunológicos de subpopulações de linfócitos T têm sido utilizados para distinguir a sarcoidose de outras patologias do interstício pulmonar(19, 27, 28). Uma elevada contagem total de células, predominantemente linfócitos, em simultâneo com uma percentagem quase normal de eosinófilos e neutrófilos e ausência de plasmócitos, distinguem a sarcoidose entre as mais comuns doenças pulmonares intersticiais (pneumonite de hipersensibilidade (PH), NSIP e FPI).

A relação CD4/CD8 encontrada no LBA demonstrou que este dado não pode ser usado isoladamente, mas apenas conjugado com os restantes métodos de diagnóstico. A razão CD4/CD8 está aumentada na maioria dos pacientes com sarcoidose, mas não em todos(19, 28, 29), e também se pode mostrar aumentada noutras patologias (FPI e PH), ainda que pouco

frequentemente(19) (a PH costuma ter essa razão diminuída podendo no entanto apresentar-se normal ou aumentada(19, 30, 31)).

A actividade da doença no momento em que o LBA é realizado, bem como os hábitos tabágicos são muito importantes para a interpretação dos resultados. Em casos graves, o número de neutrófilos também pode estar aumentado. No seguimento, e na avaliação do prognóstico e resposta ao tratamento, a análise do LBA tem menos relevância.

Outros testes de laboratoriais (calcemia, calciúria e ECA), bem como as provas de função pulmonar podem trazer achados complementares importantes(32-34).

Diagnóstico

O diagnóstico é de exclusão(24) e é suportado por três critérios: quadro clínico e imagiológico compatíveis; evidência histológica de granulomas não caseosos em dois locais diferentes e a exclusão de outras patologias com histologia ou quadro clínico/radiológico semelhantes(32-34).

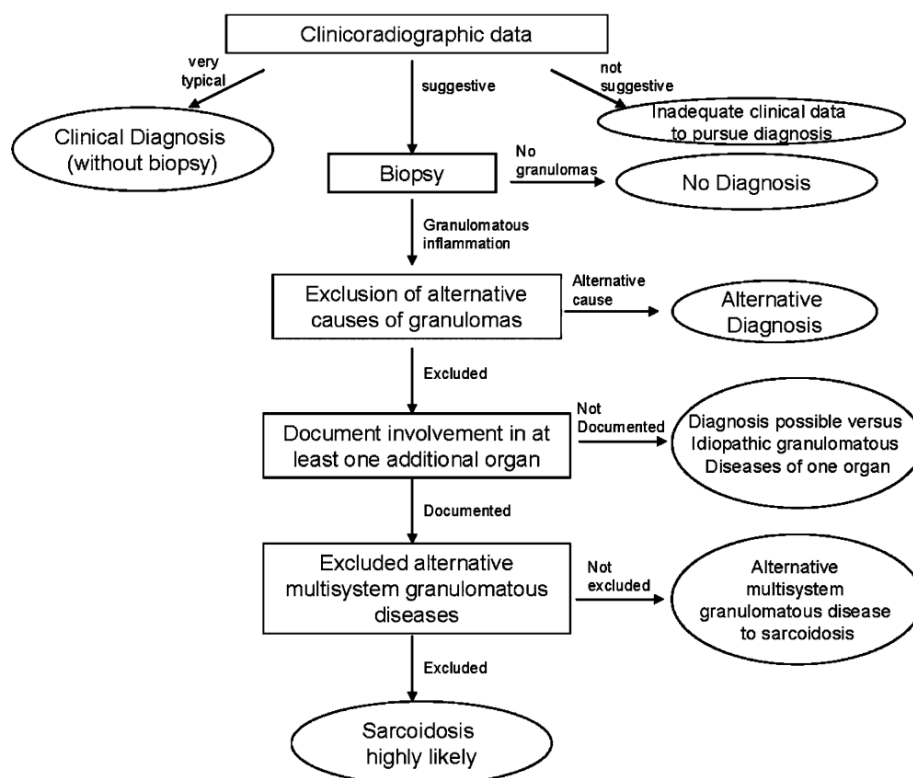


Ilustração 3 - Abordagem diagnóstica na Sarcoidose(26).

Após estabelecimento do diagnóstico é importante avaliar a extensão e gravidade da doença e detectar se está estabilizada ou em progressão para determinar se o paciente vai beneficiar de tratamento.

A melhor forma de avaliar a actividade, extensão e gravidade da doença continua a ser a investigação clínica, pesquisando sinais e sintomas relacionados com a patologia(32-34).

A resposta imunológica

Os mecanismos que conduzem á acumulação persistente de células inflamatórias e mantêm a alveolite na sarcoidose, que pode conduzir a danos irreversíveis, não são completamente compreendidos.

Se durante muitos anos se pensou que a resposta imunológica à sarcoidose era supressora pelas evidências de que a prova tuberculínica negativava em pacientes com sarcoidose e o

número de linfócitos periféricos diminuíra, a hipergamaglobulinémia observada em alguns pacientes alterou essa perspectiva(16, 32, 35, 36). Hoje atribui-se a diminuição do número de linfócitos periféricos à sua acumulação nos tecidos afectados com granulomas.

Pensa-se que a resposta imunológica na sarcoidose se inicia por uma alveolite por células mononucleares seguindo-se a formação dos granulomas por uma reacção Th1 a um antígeno não identificado(32, 37-39).

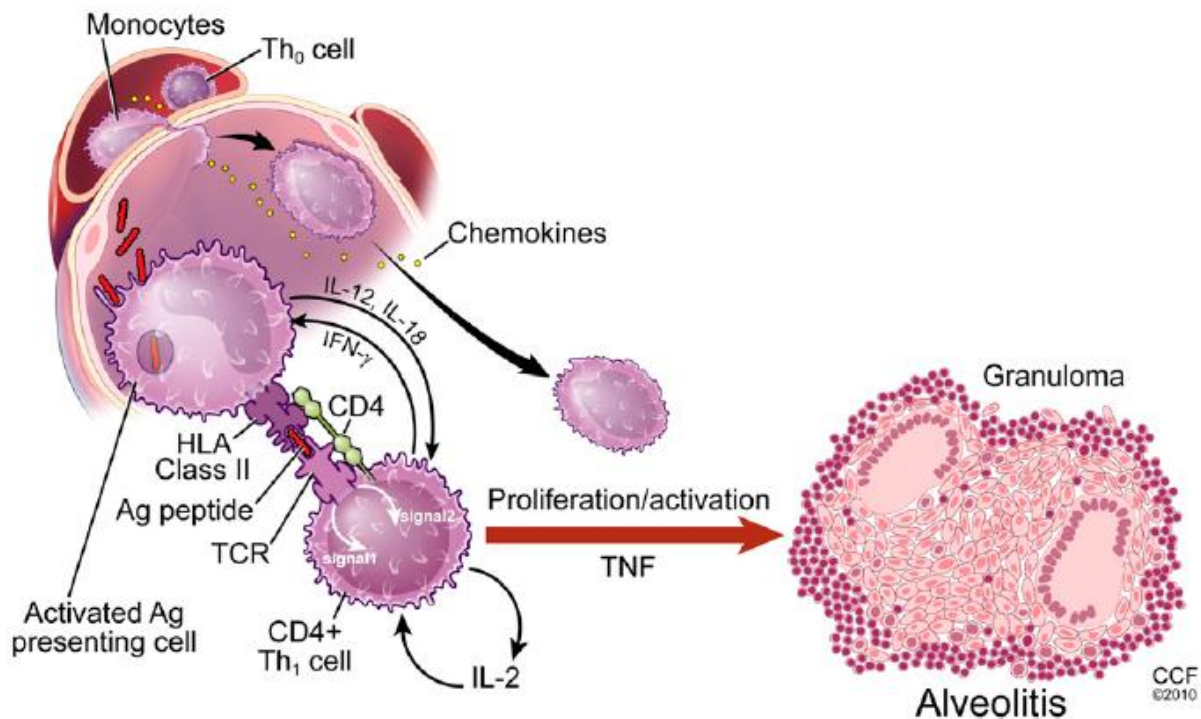


Ilustração 4 - Resposta imunológica na sarcoidose com formação de granuloma e subsequente resolução ou persistência da doença. HLA = antígeno leucocitário humano; TNF = factor de necrose tumoral; INF = interferão; TCR = receptor das células T(26).

Algumas evidências sugerem que um antígeno entra no hospedeiro e é fagocitado por células apresentadoras de antígeno (APC – antigen-presenting cell) que o processam e apresentam aos linfócitos T naïve através de moléculas de HLA de classe II e dos receptores de células T.

Os linfócitos são polarizados para um fenótipo Th1 pela resposta imune. Seguem-se o recrutamento, proliferação e diferenciação celular de leucócitos que conduzem à formação do granuloma(26). Este resulta então da acumulação de fagócitos formando uma estrutura constituída centralmente por células epitelióides rodeadas por macrófagos e linfócitos T libertadores de várias citocinas (32, 37, 38), tais como IL-1, IL-12, IL-18, e TNF- α .

Entre as diversas citocinas implicadas, o TNF- α é particularmente importante. Vários estudos documentaram a eficácia de antagonistas TNF- α no tratamento de doentes com sarcoidose(40). Fehrenbach e colaboradores demonstraram uma associação entre os níveis de TNF- α no LBA e a quantidade de precursores de granulomas no tecido pulmonar(41). Os receptores desta citocina têm várias funções imunológicas e encontram-se aumentados no plasma e LBA de doentes com sarcoidose(42).

Na sarcoidose, como também ocorre em diversas doenças crónicas, parece que se observa inicialmente uma resposta Th1 que se altera posteriormente para Th2 (IL-4 e IL-10). Esta alteração do equilíbrio Th1:Th2 pode estar relacionada com a progressão da resposta granulomatosa para fibrose irreversível(32, 43, 44).

O rácio CD4/CD8 está intensificado na resposta imunitária tipo Th1, e ainda que sugestivo, este rácio não entra na definição de sarcoidose(32, 33).

A patogénese da sarcoidose parece envolver factores genéticos, exposição a um ou vários antígenos e memória antigénica (de exposições anteriores)(26).

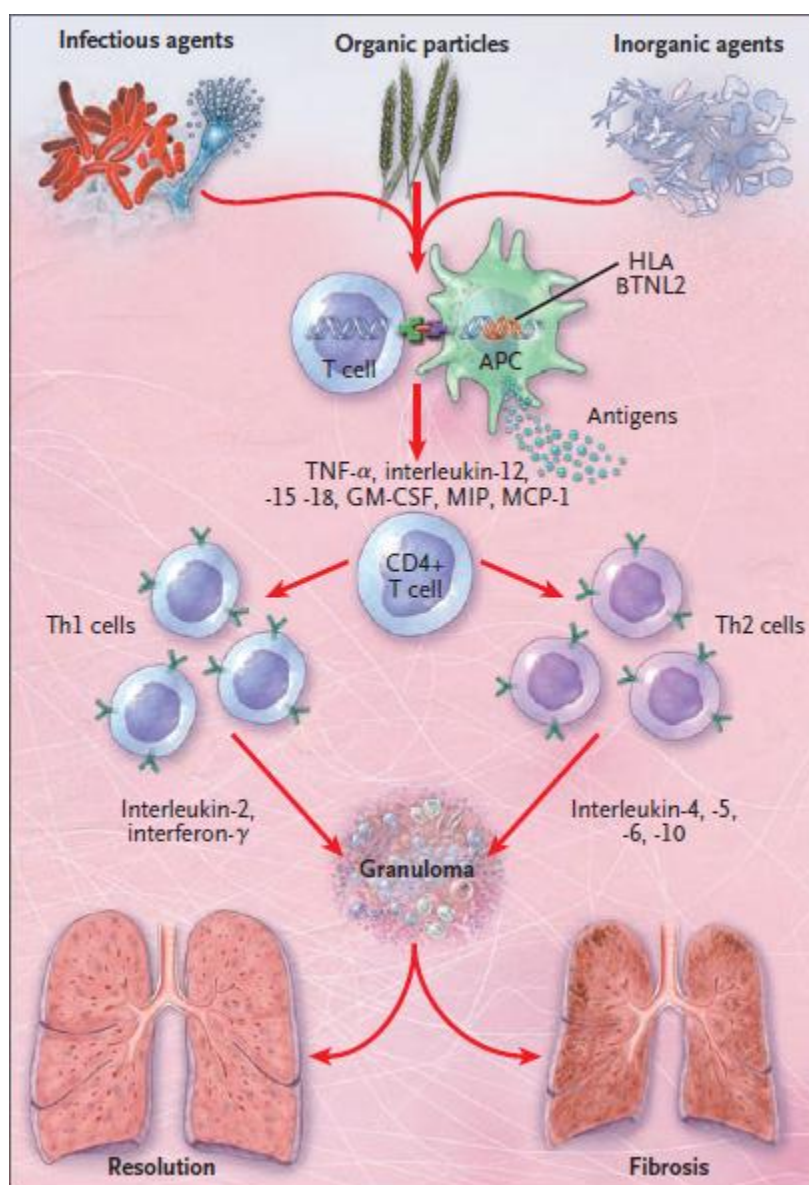


Ilustração 5 – Hipótese da imunopatogênese da sarcoidose(23). Agentes infecciosos, orgânicos e inorgânicos são possivelmente implicados na sarcoidose. Algum microorganismo causal terá sido provavelmente eliminado deixando algum produto não degradável ou levando a reação cruzada com moléculas endógenas, As APCs produzem elevadas quantidades de TNF e segregam IL-12, -15, e -18, MIP-1, MCP-1 e GM-CSF (factor de crescimento de colónias de macrófagos granulócitos). As células T CD4⁺ interagem com as APCs e iniciam a formação dos granulomas. As células T CD4⁺ activadas diferenciam-se em Th1 e libertam IL-2 e INF- γ . A eficiência deste processo está provavelmente sobre controlo genético (alelos de HLA e BTNL2) e relaciona-se com a susceptibilidade e fenótipo da sarcoidose. Os granulomas são constituídos por células epitelióides, células gigantes e células T. Estes podem persistir e evoluir para fibrose. Os macrófagos alveolares activados, no contexto do predomínio Th2 parecem estimular a proliferação e estimulação da produção de colagénio levando a fibrose progressiva(23).

Resposta imunológica no LBA

As patologias granulomatosas pulmonares apresentam geralmente manifestações clínicas semelhantes, no entanto o estudo no LBA revela diferenças entre elas (32, 36, 45).

Na sarcoidose encontra-se um predomínio de linfócitos T activados em 90% dos pacientes na altura do diagnóstico(32).

Na sarcoidose activa, o LBA, quando observado em microscopia de contraste de fase, revela linfócitos na superfície dos macrófagos alveolares formando rosetas. As células estão aderentes, não sofrendo fagocitose.

A secreção de INF- γ pelas células Th1 activa os macrófagos alveolares presentes nas respostas granulomatosas(32, 39, 43, 46) resultando libertação de elevados níveis de radicais livres de oxigénio bem como das citocinas IL-1, IL-12, IL-18 e TNF- α (32, 39, 43, 47).

Winterbauer e colaboradores encontraram nos doentes com sarcoidose um rácio CD4/CD8 superior, menos neutrófilos, e uma percentagem de eosinófilos inferior a 1 na população celular do LBA(32, 48).

A razão CD4/CD8 apresenta-se aumentada em 50 a 60% dos pacientes com sarcoidose(29, 32, 35). Em 15% dos doentes pode no entanto apresentar-se diminuída(32). Um rácio acima de 3,5 apresenta uma sensibilidade de 52 a 59% e uma especificidade de 94 a 96%. Num doente com clínica compatível, o aumento do rácio CD4/CD8 pode tornar desnecessária a realização de biópsia(29, 48). Num estudo de Winterbauer e colaboradores(32, 48), a biópsia transbrônquica demonstrou uma especificidade de 89% na distinção entre sarcoidose e outras doenças do interstício pulmonar, o que não é melhor que a relação CD4/CD8.

Na sarcoidose avançada pode ocorrer um aumento de neutrófilos e de mastócitos(32, 49, 50).

Drent e colaboradores desenvolveram um programa informático que analisa os parâmetros discutidos, bem como dados do próprio doente e discrimina com elevada fiabilidade as três principais patologias do interstício pulmonar (sarcoidose, FPI e PH) dando um resultado

percentual de probabilidade para cada uma delas). O seu uso não dispensa o contexto clínico(32, 49, 51).

A Granulomatose de Wegener (especialmente nos casos com baixa actividade) também pode apresentar uma alveolite linfocitária no LBA. No entanto a identificação de macrófagos ricos em hemossiderina estabelece a associação com hemorragia alveolar difusa existente nesse distúrbio, bem como outras vasculites, hemossiderose pulmonar idiopática, doenças do tecido conjuntivo e reacção a drogas(32, 52).

A linfadenopatia mediastínica bilateral ou hilar pode ocorrer em situação como a sarcoidose, muitas vezes benigna e auto-limitada. No entanto o seu diagnóstico diferencial conta com situações malignas cujo diagnóstico deve ser feito rapidamente, como os linfomas(32, 53).

A localização pulmonar da doença de Hodgking tem sido confirmada pela identificação de células de Reed-Sternberg em LBA(21, 32, 54). No entanto é necessário estar atento às suas variantes mononucleares e não interpretar macrófagos binucleados como células neoplásicas. Segundo um estudo de Wisecarver e colaboradores(32, 55) em 17% dos LBAs realizados em doentes com doença de Hodgkin encontravam-se células de Reed-Sternberg ou a sua variante mononuclear. Além disso, foi demonstrado que pacientes com linfomas malignos apresentam uma menor proporção CD4/CD8 no LBA, bem como no sangue periférico, relativamente à sarcoidose(32, 56).

Raramente nos deparamos com plasmócitos no LBA. Quando estes estão presentes o diagnóstico mais provável é AAE ou pneumonite induzida por drogas.

Apesar de ser uma doença de etiologia desconhecida, estudos apontam uma relação com agentes biológicos na sarcoidose(32, 57). Algumas exposições ambientais e ocupacionais causam reacções semelhantes à da sarcoidose. Trabalhadores com berílio, com fibras minerais

e com metais estão expostos ao risco de desenvolvimento da reacção granulomatosa. A avaliação destes pacientes deve incluir uma análise cuidadosa e o acompanhamento no local de trabalho, pesquisa de corpos estranhos, da presença de material bi-refringente, ou corpos de inclusão em macrófagos alveolares em amostras de LBA.

O número total de células no LBA de doentes com sarcoidose costuma apresentar-se ligeiramente aumentado. Por sua vez na PH a elevação é mais marcada(32). A proporção relativa de linfócitos parece estar mais elevada em pacientes com a doença clinicamente activa. No entanto existe elevada sobreposição nas percentagens de linfócitos entre doentes com patologia activa e inactiva e o LBA chega a ser normal em 10 a 15% dos pacientes(32, 36, 58).

Actividade e prognóstico

A actividade da doença não deve ser confundida com a sua extensão ou gravidade (isto é, o número dos órgãos envolvidos, ou a densidade de granulomas nos órgãos envolvidos), nem lhe deve ser associado prognóstico desfavorável (por exemplo, a doença aguda muito activa, manifestando-se como síndrome Löfgren, tem um excelente prognóstico). Não deve ser também relacionada com a necessidade de início da corticoterapia(32, 33, 43).

Vários biomarcadores têm sido discutidos como potencial na avaliação da actividade da doença, quer no soro quer no LBA, mas nenhum se revelou ainda adequado ao uso de rotina(32, 39, 43).

A actividade da doença relaciona-se com a presença de células T e persistência de inflamação com macrófagos e formação de granulomas. Aumento dos níveis séricos do sIL-2R e da ECA estabelecem um potencial da doença para progredir. A doença inactiva tem maior probabilidade de não progredir.

Actualmente, avalia-se a actividade da doença pelo exame clínico(32, 34).

Vários estudos demonstraram que o grau de linfocitose no LBA no momento do diagnóstico não tem valor prognóstico(29, 32, 34, 58, 59). A linfocitose é encontrada em vários distúrbios como doenças granulomatosas extratorácicas, doença de Crohn e cirrose biliar primária.

Os pacientes com bom prognóstico e alta probabilidade de remissão espontânea (síndrome de Löfgren) podem apresentar uma relação CD4/CD8 elevada (32, 58, 60). Planck e colaboradores(32, 44) demonstraram que o aumento da razão CD4/CD8 no LBA foi associado a um prognóstico favorável(32, 58-60).

O valor dos neutrófilos parece ser mais promissor. Dois grupos independentes demonstraram que um aumento da percentagem de neutrófilos (> 3,0%) no LBA de doentes com diagnóstico recente de sarcoidose pulmonar se relaciona com agravamento clínico durante o seguimento e um risco acrescido de necessidade de corticoterapia sistémica(50, 61).

Algumas doenças infecciosas podem mimetizar os granulomas da sarcoidose e apresentar uma linfocitose no LBA indistinguível desta, sendo por vezes a cultura destes agentes negativa. Falamos de gérmes como a *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia*, a *Leishmania spp* e *Mycobacterium tuberculosis*. Por outro lado, pacientes com sarcoidose sob corticoterapia estão mais susceptíveis a infecções oportunistas(32, 62-65). O agravamento clínico nesta situação justifica pesquisa no LBA dos agentes através de PCR (polymerase chain reaction) e o teste do antígeno do *Aspergillus*.

A investigação de biomarcadores na sarcoidose

Vários parâmetros serológicos, incluindo citocinas, os seus receptores solúveis, enzimas e outros componentes do soro, incluindo as proteínas específicas do epitélio pulmonar foram

considerados para investigar diferentes aspectos da actividade inflamatória e assim reflectir a gravidade da doença e ajudar na identificação precoce de doença progressiva(7, 66).

Embora os níveis desses biomarcadores tenham uma relação estreita com a patogénese da doença(67, 68), ainda não dispomos de informações suficientes a respeito do seu valor para a avaliação da sua gravidade e prognóstico.

Considerações genéticas

Vários estudos sugerem o envolvimento dos genes HLA no fenótipo e evolução da sarcoidose(33). Alguns parecem ser factores de risco para a doença como o HLA-DRB1*1101 e HLA-DPB1*0101(69). O HLA-DRB1*03 está associado com o desenvolvimento de síndrome de Löfgren em suecos, com posterior resolução da doença(70). Outros estudos demonstraram a provável influência dos genes HLA tanto de classe 1 como classe 2 com o aparecimento e curso clínico da sarcoidose(24, 69, 70). Foi sugerido que os HLA-DRB1*01 e HLA-DRB1*04 estão negativamente associados à sarcoidose, enquanto outros como o HLA-DRB1*03, 11, 12, 14 e 15 têm sido associados a um aumento do risco (24).

Biomarcadores de actividade e prognóstico

Do ponto de vista clínico é mais importante saber se a sarcoidose é grave do que se está activa. Neste sentido Ziegenhagen e colaboradores(71) examinaram a capacidade de alguns parâmetros séricos e do LBA na avaliação da probabilidade de progressão em doentes com sarcoidose. Observaram que quase metade dos pacientes sem indicação inicial para tratamento com corticóides sistémicos, que tinham níveis séricos elevados de sIL-2R sofriam uma

deterioração da doença, enquanto nenhum dos que tinham valores normais sofreram esta evolução. A supracitada observação sugere fortemente que este parâmetro imune poderia vir a servir como um guia para o prognóstico, identificando pacientes com maior risco de deterioração, possivelmente com o uso associado de achados clínicos(7). A eficácia da sIL-2R na avaliação da gravidade da sarcoidose foi confirmada por outro estudo do mesmo grupo (72) que mostrou concentrações de sIL-2R significativamente elevadas nos pacientes com sarcoidose progressiva. Concluíram também que as concentrações séricas da ECA não diferiram significativamente entre os pacientes com sarcoidose estável ou progressiva indicando um valor preditivo fraco para este biomarcador.

A ECA é segregada por monócitos, macrófagos e por células epitelióides na sarcoidose pulmonar(42). Alguns autores sugerem que uma elevação dos níveis plasmáticos da ECA se relaciona com alterações radiográficas(73) enquanto outros demonstraram que o seu valor prognóstico é pobre(74, 75). Múltiplos estudos exploraram o papel da ECA concluindo que os seus valores são extremamente variáveis e alteráveis por diversos factores. Um dos factores mais importantes, responsável por 25% desta variação, é um polimorfismo genético(76-79). Permanece a questão se os valores corrigidos em função do genótipo melhoram a capacidade da ECA como biomarcador da actividade da sarcoidose(7).

A actividade da ECA no sangue é considerada um biomarcador de formação de granulomas com baixa especificidade (50 a 60%). Deve ser analisada em conjunto com outros biomarcadores e precisa de ser relacionada com o fenótipo clínico e alterações radiológicas para ser usada para o diagnóstico e seguimento(73).

Quimiocinas na sarcoidose:

Os primeiros a estudar o papel das quimiocinas na sarcoidose foram Hashimoto e colaboradores(80). Realizaram uma avaliação longitudinal dos níveis plasmáticos de MCP-1 e de MIP-1 α num pequeno número de doentes e demonstraram uma relação próxima entre os níveis plasmáticos destes biomarcadores e o curso clínico da doença (definido pelos parâmetros laboratoriais e radiológicos).

Iyonaga e colaboradores(81) demonstraram que a origem do aumento dos níveis plasmáticos de MCP-1 é da responsabilidade dos macrófagos na periferia dos granulomas sugerindo este biomarcador como um indicador da formação de granulomas e consequentemente da actividade da sarcoidose(7).

Proteínas do epitélio pulmonar

Kobayashi e colaboradores(81) foram os primeiros a demonstrar a correlação entre os níveis plasmáticos do KL-6 e as mudanças consistentes na actividade da sarcoidose sugerindo-o como um potencial indicador da gravidade da doença(7).

Hermans e colaboradores(82) analisaram o papel da CC16 (biomarcador da integridade da membrana alvéolo-capilar). Demonstraram que os seus níveis séricos são influenciados pela extensão do envolvimento pulmonar, tal como definida pelas alterações radiológicas, indicando um papel potencial desta molécula como um parâmetro não-invasivo e facilmente reprodutível para a avaliar da gravidade da doença(7).

Janssen e colaboradores(83) demonstraram maior sensibilidade do KL-6 *versus* o CC16 em discriminar doentes com sarcoidose, não sendo ambos específicos das DPI(84, 85). Os valores preditivos foram inconclusivo(86) sendo que a análise foi retrospectiva e não foram realizados doseamentos seriados(7).

Outros biomarcadores

Miyoshi e colaboradores(87) fizeram um estudo comparativo de vários biomarcadores que já se tinham mostrado eficazes na avaliação da alveolite linfocítica e progressão da sarcoidose. Avaliaram quer a citologia do LBA quer os níveis séricos de SAA, sIL-2R, lisozima, ECA e o KL-6. Os resultados sugerem que os níveis séricos iniciais de sIL-2R, lisozima (análise univariada) e KL-6 (análise multivariada) podem reflectir a alveolite linfocítica na sarcoidose pulmonar. Além disso, o nível sérico inicial de KL-6 tende a associar-se com a infiltração do parênquima. Neste estudo, quer o número de linfócitos quer a contagem total de células do LBA foram significativamente maiores em pacientes com infiltração do parênquima pela doença. Estes resultados sugerem que o número de células totais e linfócitos no LBA também estão correlacionados com a infiltração pulmonar, assim como sIL-2R, lisozima, e KL-6.

A lisozima é um enzima produzido por macrófagos e monócitos. Na sarcoidose é produzido por macrófagos e células epitelióides envolvidas na formação de granulomas (geralmente não é expresso em granulomas com maior tempo de evolução). Encontra-se elevado no plasma em mais de 30% dos doentes com sarcoidose mas também noutras doenças pulmonares. Os seus níveis parecem poder ser correlacionados com a ECA sérica. O seu clínico deste enzima seria assim na monitorização da evolução e gravidade da doença e não tanto para fins diagnósticos(42).

O estudo de Kitamura e Kobayashi(88) relatou que não houve diferença significativa entre os níveis séricos de KL-6 em pacientes com maiores ($\geq 30\%$) ou menores ($<30\%$) percentagens de linfócitos no LBA.

Chen e colaboradores demonstraram que os granulomas na sarcoidose se caracterizam por uma deposição extensa de SAA. Esta proteína é capaz de provocar uma resposta imune com libertação de citocinas. Curiosamente os seus níveis séricos foram relacionados com a actividade da sarcoidose(89).

As células T reguladoras, essenciais na supressão na imunidade mediada por células, estão aumentadas no sangue periférico, no LBA e nos granulomas de doentes com sarcoidose activa. No entanto estas células parecem funcionalmente alteradas (menos funcionais quando comparadas com as dos indivíduos sem doença). As células NK (*natural killer*), capazes de limitar respostas imunes mediadas por linfócitos T CD4, encontram-se significativamente diminuídas no sangue e LBA dos doentes com sarcoidose, excepto no síndrome de Lofgrøn. Isto leva-nos a supor que a diminuição das células NK se possa relacionar com a persistência da sarcoidose(24).

Um biomarcador da activação de células T que tem sido relacionado com a actividade da sarcoidose é a neopterina, um metabolito da guanosina trifosfato, segregado por macrófagos activados por $\text{INF-}\gamma$ *in vitro*. As concentrações de neopterina apresentaram-se aumentadas no soro e urina de doentes com sarcoidose quando comparados com controlos, e em doentes com doença activa relativamente aos com sarcoidose inactiva(90). Os níveis séricos de neopterina parecem ter um valor preditivo semelhante ao sIL-2R(72, 91).

Numa contínua pesquisa de potenciais biomarcadores, Bargagli e colaboradores(42) testaram os níveis séricos da quitotriosidase, uma enzima envolvida na degradação da quitina expressa por macrófagos activados. Os investigadores encontraram os níveis desta enzima elevados em mais de 90% dos doentes com sarcoidose comparando com controlos. Breunner e colaboradores(92) encontraram níveis elevados nos doentes em fase activa comparando com os doentes em fase inactiva. A quitotriosidase poderá induzir um aumento da expressão de citocinas pró-fibróticas Th2 e ser capaz de informar sobre a gravidade e prognóstico da doença(24). Este enzima está elevado no soro de doentes com vários tipos de patologias mas não em outras doenças granulomatosas ou intersticiais pulmonares(42).

Foi ainda encontrada relação positiva entre as concentrações de quitotriosidase e as concentrações plasmáticas da ECA, do sIL-2R e os estádios radiológicos(93). O mesmo se

verifica no LBA, sendo que neste, a quitotriosidase revelou maior sensibilidade (mais de 85% dos doentes com sarcoidose mostraram elevação) e valor prognóstico que a ECA(42).

Dos parâmetros serológicos investigados, apenas os níveis séricos do receptor solúvel de IL-2 e de neopterina foram associados com a gravidade da doença(32, 61).

O perfil de expressão celular não revela um parâmetro único capaz de distinguir sarcoidose das restantes patologias do interstício pulmonar, no entanto a combinação de várias características pode estabelecer uma direcção diagnóstica.

Terapêutica na sarcoidose

As decisões terapêuticas na sarcoidose devem ter em conta que muito doentes têm regressão espontânea devendo a terapêutica ser limitada à sarcoidose sintomática ou progressiva. Depois de iniciada a corticoterapia muitos pacientes precisam de terapêutica a longo prazo. No entanto, os estudos(94, 95) não têm demonstrado que a corticoterapia ou qualquer outra terapia previna a progressão ou fibrose(26).

O TNF- α revela-se das citocinas mais importantes na fisiopatologia da sarcoidose. Ziegenhagen e colaboradores(61) demonstraram que os pacientes com sarcoidose progressiva, especialmente os resistentes aos corticóides, apresentam um aumento significativo de libertação de TNF- α pelos seus macrófagos alveolares em cultura e as terapêuticas anti-TNF- α têm mostrado sucesso na doença refractária(32, 40).

O infliximab, um anticorpo monoclonal anti-receptor do TNF- α , foi testado num estudo aleatorizado duplamente cego, revelando-se superior ao placebo no tratamento da sarcoidose pulmonar(40). Numa análise retrospectiva este agente mostrou-se superior a qualquer outro agente no controlo da doença(96). Apesar do descrito, foram reportados casos de reacções tipo sarcoidose em pacientes que usaram diferentes fármacos da classe anti-TNF para outras doenças(26). Estes dados sugerem que a introdução do anti-TNF induziu um desequilíbrio no

balanço das citocinas e reforçam a complexidade da reacção imunológica da sarcoidose e que a manipulação de apenas uma citocina é incapaz de resolver todos os aspectos da doença.



Fibrose Pulmonar idiopática

A FPI é uma doença definida como uma forma específica, crónica e progressiva de fibrose intersticial pulmonar, de causa desconhecida que ocorre tipicamente pela sexta ou sétima décadas de vida. A sua definição requer a exclusão de outras IIP e outras DPI associadas a exposição ambiental, ocupacional ou doenças sistémicas(97).

Dados epidemiológicos

A incidência da FPI é estimada em 2 a 29 casos por 100.000 habitantes por ano(97). A prevalência parece ter vindo a aumentar e a sobrevivência média após o diagnóstico é de 2 a 3 anos não existindo terapia eficaz(98). É mais comum em homens e a maioria tem história de tabagismo(97). É muito rara antes dos 50 anos. Os pacientes nesta faixa etária provavelmente têm uma DTC subclínica no momento do diagnóstico de FPI.

Clínica

Clinicamente classifica-se por uma dispneia de esforço crónica inexplicada, tosse, ferveores inspiratórios bibasais e dedos em baqueta de tambor.

Recentemente foi demonstrado que a evolução clínica da FPI cursa com períodos de estabilidade clínica com exacerbações pontuais de declínio respiratório agudo(98, 99).

Diagnóstico

O algoritmo diagnóstico segundo as novas *guidelines* da ATS/ERS/JRS/ALAT é apresentado na ilustração 3.

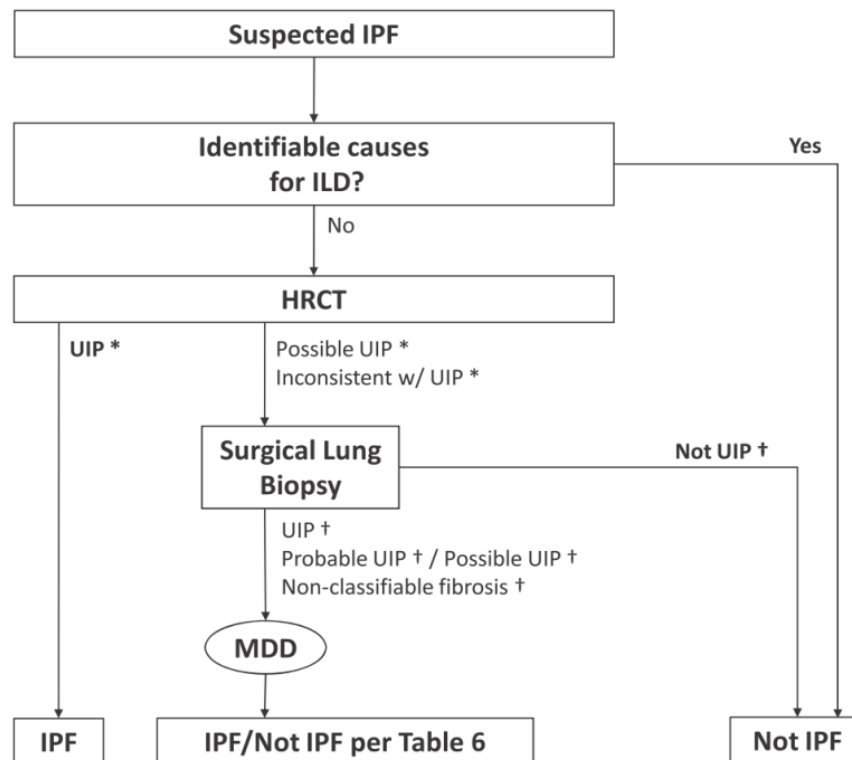


Ilustração 6 Algoritmo de diagnóstico para a FPI [86].

Recomendações terapêuticas

Quanto às recomendações terapêuticas, como nenhuma terapêutica farmacológica demonstrou evidência de ser benéfica, as *guidelines* da ATS 2011 optaram por estabelecer diversos graus de recomendação contra a maioria das terapias direcionadas/específicas (de pouco a nada recomendado dependendo de cada situação individual de doença).

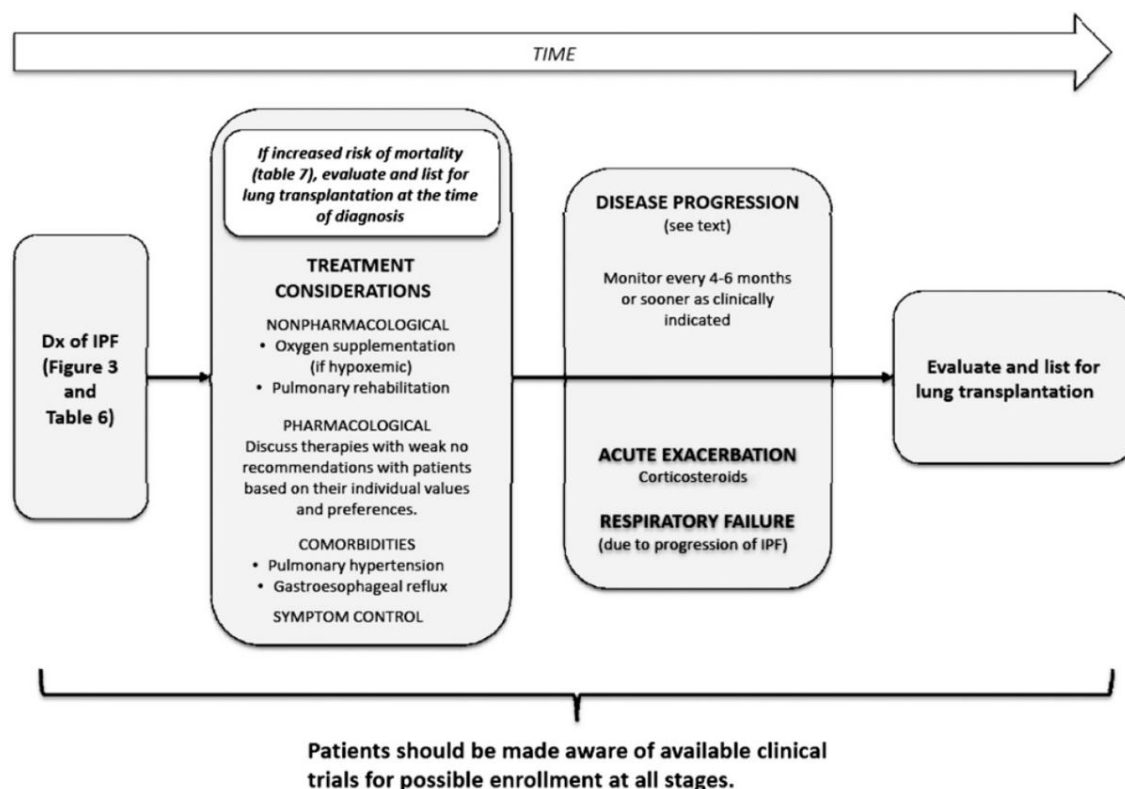


Ilustração 7 - Tratamento preconizado na FPI (ATS 2011) [86].

Padrão histológico, dificuldades no diagnóstico diferencial e prognóstico

O padrão histológico UIP, achado típico na FPI é muitas vezes indistinto do observado na fibrose pulmonar associado às doenças do tecido conjuntivo (DTC). Song e colaboradores(100) realizaram um estudo retrospectivo no qual estudaram 100 pacientes (39 com UIP-DTC e 61 com UIP-FPI) diagnosticados com biópsia cirúrgica. A sobrevivência era claramente superior nos pacientes com UIP-DTC.

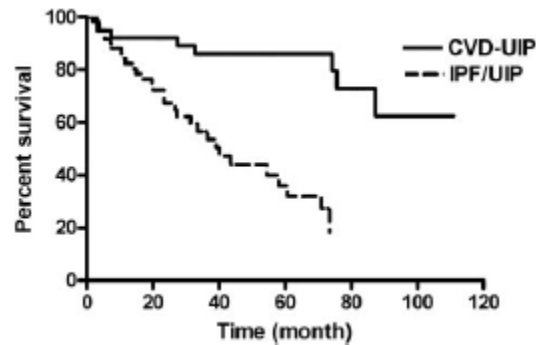


Ilustração 8 - Comparação de curvas de sobrevivência entre UIP-DTC e UIP-FPI(100).

No mesmo estudo concluiu-se que não houve diferenças clínicas significativas na função pulmonar, PaO_2 em repouso, e no LBA entre os dois grupos. Quanto à histologia, os doentes com UIP-DTC mostraram menos focos fibroblásticos, maiores centros germinativos e maiores níveis de inflamação total comparados com os UIP-FPI, sem outras diferenças. No estudo imagiológico, os doentes com UIP-DTC apresentaram menores níveis de enfisema e mais frequentemente um padrão não típico de UIP, sem imagens em “favo de mel” relativamente aos com UIP-FPI. Concluíram assim que os centros germinativos na histologia constituem a melhor ferramenta para distinção entre as duas patologias.

Estes dados reforçam a necessidade de encontrar um método mais eficaz para distinção destas patologias, uma vez que a biópsia cirúrgica é um método invasivo que não é passível de ser realizado em muitos destes doentes.

Investigação da patogenia

A patogenia da FPI permanece mal compreendida. Associa-se a um predomínio de citocinas Th2 e uma escassez de citocinas Th1(101). Estudos sobre a imunopatologia(101) e expressão génica(102, 103) revelaram que o tecido pulmonar de pacientes com FPI apresenta níveis

anormalmente elevados de IL-4 e IL-5, e um nível baixo de IFN- γ . A avaliação de citocinas intracelulares das células do LBA por citometria de fluxo mostrou um padrão similar(47).

A NSIP, em comparação com a FPI, cursa com menor grau de fibrose e tem melhor resposta a agentes esteróides e anti-proliferativos. As duas doenças podem induzir diferentes padrões de fibrose relacionada com os respectivos perfis citocínicos. Já foi demonstrado que NSIP e FPI podem expressar diferentes níveis de citocinas inflamatórias e quimiocinas CXC, como a IL-6, IL-8, INF- γ , RANTES, MCP-I, mas pouco é conhecido sobre como diferem as citocinas Th2 e Th1 e seus receptores entre as duas condições(104). Park e colaboradores colocaram a hipótese de uma regulação diferente de IFN- γ , IL-4 e IL-13 e de uma possível expressão diferente de IL-13R α 1 e IL-13R α 2 e em doentes com FPI e NSIP. Mediram os níveis de IL-4, IL-13 e IFN- γ no LBA de doentes com FPI (n=16), NSIP (n=10) e de controlos normais (n=8) e compararam a expressão de IL-13R α 1 e IL-13R α 2 nos tecidos pulmonares usando ELISA e imunohistoquímica. Concluíram que a IL-13 e seus receptores parecem contribuir para a fibrose e os seus níveis parecem estar relacionados com a gravidade da doença (encontrava-se significativamente aumentada nos doentes com FPI em relação aos restantes). Os autores encontraram ainda uma correlação inversa entre os níveis de IL-13, a CVF e a DLCO (capacidade de difusão do monóxido de carbono) na FPI e NSIP. A IL-13 foi fortemente expressa no músculo liso, no epitélio brônquico, macrófagos alveolares e no endotélio de pacientes com FPI. O IL-13R α 1, ao invés de IL-13R α 2, foi fortemente expresso no músculo liso, epitélio brônquico e endotélio de doentes com FPI. IL-13 e seus receptores podem contribuir para a patogénese da fibrose nas PII e parecem estar relacionados com a gravidade da doença(104). Os níveis de IFN- γ mostraram-se diminuídos em pacientes com NSIP relativamente aos controlos. A IL-4 revelou-se aumentada nos doentes com FPI e NSIP em relação aos controlos.

No entanto, o papel destas substâncias nas PII permanece desconhecido(104).

FPI vs DTC

Alguns dos estudos prévios sugeriam que a UIP-DTC poderia ser prevista pela presença de linfocitose no LBA(105). No entanto, resultados de Nagai e colaboradores(106), em doentes com UIP histologicamente comprovada, apresentavam aumento dos neutrófilos, mas apenas uma discreta linfocitose no LBA

Nos casos UIP-FPI, uma histologia de UIP pode ser prevista pela baixa contagem de linfócitos no LBA(107), mas este dado pode conduzir a uma previsão histológica errada pois também está presente na DTC não ES (esclerose sistémica). Wells e colaboradores(108), acrescentam ainda que doentes com UIP-FPI revelaram maior número total e percentual de eosinófilos que doentes com UIP-ES.

O LBA revelou linfocitose nos pacientes com UIP-DTC, excepto no que respeita à ES, mas não em pacientes com UIP-FPI(105). Estas diferenças podem ser devidas a variações do espectro de UIP entre os doentes com FPI e DTC.

Para esclarecer como o perfil clínico da UIP difere entre FPI e DTC Nagao e colaboradores(105) fizeram uma marcação histopatológica de amostras de pulmão, obtidas por biópsia cirúrgica, de 31 doentes (16 FPI, 9 DTC 6 dos quais ES), utilizando um método de avaliação semi-quantitativo para procurar diferenças histopatológicas que reflectissem a linfocitose no LBA. Em comparação com FPI e casos de ES, os pacientes com DTC não ES apresentaram menores níveis de fibrose e celularidade no espaço alveolar (indicador de gravidade). Os linfócitos estavam principalmente localizados nas paredes alveolares e a maioria das células nos espaços alveolares eram macrófagos. Por outro lado, outros parâmetros como a celularidade e o infiltrado na parede alveolar não variaram entre os três



grupos. Concluíram que a existência de menos macrófagos nos espaços alveolares e um menor grau de fibrose podem contribuir para a linfocitose no LBA observada em pacientes com UIP-DTC não-ES(105).

Neste estudo não foram incluídos fumadores uma vez que este hábito influencia a celularidade do LBA(105).

Ainda resta perceber se a infiltração de linfócitos contribui para o desenvolvimento de uma fibrose pulmonar (temporalmente heterogênea) nos doentes com lesões UIP. Vários resultados indicam que os linfócitos podem desempenhar um papel nos processos fisiopatológicos da fibrose pulmonar. Este facto foi sustentado por estudos anteriores de Nagao: um aumento da produção do factor de crescimento e do factor de diferenciação celular das células B no LBA em casos de FPI(109), e um atraso na apoptose das células B dentro dos folículos linfóides no tecido pulmonar de pacientes com UIP-FPI(110).

Na prática clínica, uma linfocitose no LBA pode ser um índice para avaliar a resposta à terapêutica ou as consequências clínicas de lesões de UIP. Uma elevação dos linfócitos no LBA pode sugerir um diagnóstico histológico UIP errado (em biópias não cirúrgicas), pois pode tratar-se de DTC. Uma escassa linfocitose no LBA contribui para uma maior sensibilidade no diagnóstico de UIP-FPI(111).

O grau de fibrose e o número de macrófagos no espaço aéreo foram menores na UIP-DTC não-ES com linfocitose no LBA do que naqueles com UIP-FPI e UIP-ES, e os dois últimos grupos apresentaram uma escassez de linfócitos no LBA.

Histopatologia da FPI

A FPI é caracterizada histopatologicamente por um envolvimento heterogêneo do parênquima, com áreas de fibrose irregular, focos fibroblásticos e zonas em favo de mel, a que se associam alterações do epitélio com distorção da arquitectura alveolar e hiperplasia de

pneumócitos tipo II atípicos, especialmente nas áreas de lesão e fibrose(98). Tem sido proposto que o epitélio alveolar desempenha um papel crítico na patogénese da FPI por promover activamente a proliferação, migração e activação de fibroblastos e miofibroblastos e até mesmo como uma fonte de miofibroblastos(98). Ocorre acumulação de miofibroblastos e um processo cicatricial progressivo. As células mesenquimatosas são responsáveis pela deposição de proteínas da matriz extracelular, tais como colagénio e fibronectina que se acumulam, dificultando as trocas gasosas.

As células mesenquimatosas poderão ter origem em:

- fibroblastos pulmonares que proliferam e se diferenciam em miofibroblastos (produtores de colagénio e outras proteínas que contribuem para o colapso alveolar e tracção das bronquiectasias);
- células epiteliais que são reprogramadas adquirindo um fenótipo mesenquimatoso;
- precursores circulantes da medula óssea recrutados para o pulmão.

Fisiopatologia da EA-FPI e relação EA-FPI vs ARDS

A fisiopatologia da exacerbação aguda da fibrose pulmonar idiopática (EA-FPI), que resulta em morte em até metade dos casos, tem sido alvo de estudo(98).

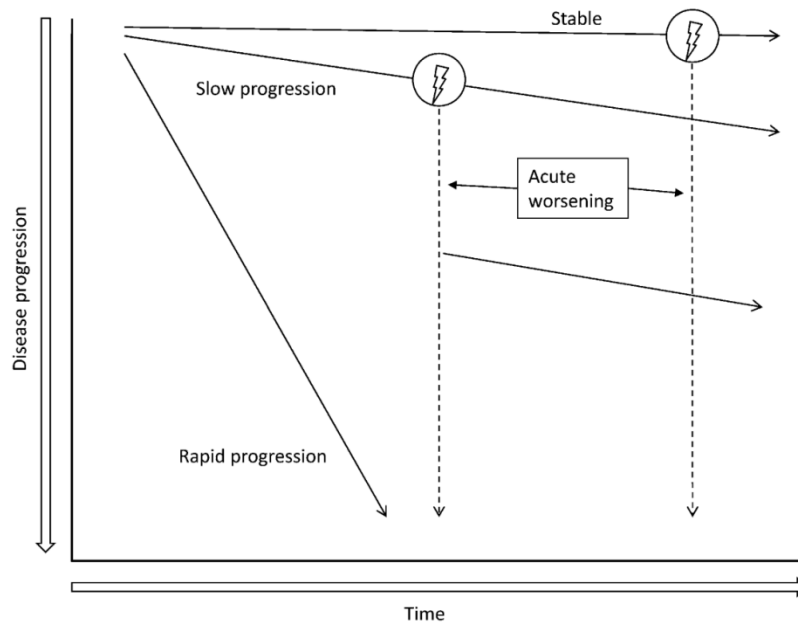


Ilustração 9 - História natural da FPI (Guidelines ATS 2011)(97). A FPI pode permanecer estável, progredir lentamente ou abruptamente.

Moeller e colaboradores(112) fizeram um estudo de coorte no qual incluíram 58 doentes com FPI (7 em fase de exacerbação e 51 estáveis). Foi encontrada uma percentagem de fibrócitos circulantes significativamente aumentada nos dois grupos quando comparada com a percentagem de voluntários saudáveis, sendo ainda mais evidente nos pacientes em exacerbação. Curiosamente, doentes com ARDS (síndrome da dificuldade respiratória aguda do adulto) não expressavam aumento na percentagem de fibrócitos circulantes. Este resultado poderá estar relacionado com o facto de nenhum dos 10 pacientes com ARDS incluídos ter vindo a evoluir para fibrose pulmonar. Os mesmos autores concluíram ainda que a percentagem de fibrócitos circulantes pode vir a ser usada como biomarcador para a FPI, principalmente para sinalizar agudizações e que uma percentagem de fibrócitos circulantes >5% é um indicador de mortalidade precoce independente na FPI(112).

Outra evidência da disfunção do epitélio alveolar na FPI prende-se com os dados que demonstram um aumento do stress oxidativo no retículo endoplasmático e apoptose associada(98, 113). Vários estudos demonstraram telómeros mais curtos em pacientes com FPI, sugerindo que o envelhecimento do epitélio alveolar contribui para o desenvolvimento de hipertensão pulmonar e fibrose(98, 114).

O ARDS fibroproliferativo é histologicamente semelhante à EA-FPI indicando mecanismos fisiopatológicos similares. Quando ocorre lesão pulmonar associada a ARDS, os biomarcadores de lesão de pneumócitos tipos I estão mais elevados relativamente ao que acontece na EA-FPI, o que argumenta a favor da inexistência de associação de FPI com lesão prévia. Estes resultados sustentam a hipótese de que a EA-FPI não é um sub-grupo de lesão pulmonar aguda tardia (relacionada com ARDS), mas sim uma entidade com provável patogénese e perfil de biomarcadores próprios. Isto sugere patologias com vias patogénicas diferentes que culminam numa doença final comum(98). O que é também suportado pela percentagem de fibrócitos circulantes estudada por Moeller descrita em cima.

Uma explicação alternativa para o diferente perfil de expressão de biomarcadores pode ser a sua relação com a gravidade da lesão aguda bem como do estado subjacente do pulmão(98).

Kubo(115) demonstrou que os pacientes com FPI que receberam terapêutica com corticosteróides e anticoagulação associada tiveram melhores resultado que os que receberam corticosteróides com placebo. Os pacientes com EA-FPI que faleceram tinham níveis de d- dímeros mais elevados relativamente aos pacientes que sobreviveram. Isto é compatível com a hipótese de Collard de que um ambiente procoagulante e de disfunção endotelial têm um papel central na patogenia da EA-FPI(116).

Actividade e seguimento da FPI

Clinicamente avalia-se a actividade e acompanha-se o curso da doença com TCAR, PFR, LBA e características histológicas(7). No entanto, existem problemas com a sensibilidade, dependência do operador e principalmente o problema da necessidade de repetição destes exames para a melhor compreensão do processo (o que implica tempo)(7).

Biomarcadores de actividade

Honda e colaboradores(117) publicaram um estudo pioneiro há quinze anos desenvolvendo um novo campo de investigação. Os autores relataram a utilidade potencial dos níveis séricos de SP-D em reflectir actividade da doença em doentes com diferentes DPI (FPI e DTC-DPI). Os níveis séricos de KL-6 foram avaliados por Kobayashi e colaboradores(118) para testar a sua capacidade de avaliar a actividade da pneumonite que ocorre na DPI na busca de uma potencial ferramenta de diagnóstico diferencial e de avaliação da resposta ao tratamento. Encontraram concentrações distintas de KL-6 entre doentes com DPI e não DPI, bem como uma correlação clara dos níveis de KL-6 com a actividade clínica das DPI. Apesar de resultados promissores, uma elevação dos níveis séricos de KL-6 e de SP-D sugere mas não estabelece o diagnóstico diferencial de DPI. Carecem ainda, além disso, de estudos em grande escala(7).

Biomarcadores de diagnóstico diferencial, seguimento e prognóstico

Ohnishi e colaboradores conduziram um estudo comparativo em que analisaram diversos factores do processo inflamatório mediado pelos monócitos e macrófagos em várias DPI(119, 120). Foi feita a análise através de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) dos valores de diagnóstico de KL-6, SP-A, SP-D e MCP-1 num conjunto de amostras de soro de

doentes com FPI e DTC-DPI. Este estudo demonstrou que o KL-6 se destaca ao nível da precisão de diagnóstico, sensibilidade e especificidade. A análise estatística confirmou que os quatro biomarcadores são específicos para FPI, e superiores aos biomarcadores anteriormente descritos(7, 121). No entanto, os níveis séricos dos quatro biomarcadores podem ser influenciados pela presença de outras DPI que não FPI, bem como outras doenças pulmonares tais como neoplasias, inflamações sistémicas e infecções pulmonares fibrosante(14, 85, 122). Perante esta informação Takahashi e colaboradores(123) avaliaram os níveis séricos de SP-A e SP-D em doentes com FPI e correlacionaram-nos com os parâmetros radiológicos e funcionais. Demonstraram uma correlação positiva entre os níveis séricos de ambos os biomarcadores e o grau de alveolite, não sendo observada correlação com a progressão da fibrose. Os autores mostraram ainda uma relação entre o aumento da concentração de SP-D e o rápido declínio das PFR.

Note-se no entanto, a fraca correlação dos níveis séricos de SP-A e SP-D com os dados da TC e a inconclusiva relação com a mortalidade.

Takahashi e colaboradores(124) prosseguiram estudos avaliando o papel das proteínas SP-A e SP-D no prognóstico de doentes com DPI e pesquisaram o mecanismo da sua elevação sérica. As concentrações de SP-A e SP-D estão significativamente diminuídas no LBA de pacientes com FPI e DPI-DTC (117, 125). O total de fosfolípidos no LBA está também reduzido em pacientes com FPI(126). A diminuição da renovação de proteínas e lípidos na formação do surfactante sugere uma modificação funcional dos pneumócitos tipo II.

Takahashi e colaboradores(124) avaliaram 82 doentes com FPI concluindo que níveis elevados de SP-D no momento do diagnóstico estavam associados a um pior prognóstico enquanto os níveis de SP-A não parecem relacionados com a sobrevivência. O aumento dos níveis, que parece associar-se a alveolite e não a fibrose, pode estar relacionado com o aumento da permeabilidade alveolar que também acontece na inflamação intersticial.

Os resultados típicos das PFR na FPI são consistentes com uma insuficiência restritiva (sendo as variáveis chave a CV (capacidade vital) e a CPT (capacidade pulmonar total). Na tentativa de encontrar uma relação entre estes parâmetros e os biomarcadores proteínas do surfactante, os autores estudaram um conjunto de indivíduos com FPI e encontraram um relação significativa entre os níveis do SP-D, no momento inicial do estudo, e a velocidade de declínio percentual da CV e da CPT, o que não ocorreu com a SP-A(123).

O aumento de SP-D parece ser causado pela lesão epitelial em curso e o sucessivo processo de fibrose, e não pela fibrose instalada.

Jegal e colaboradores(127) baseados numa análise multivariada mostraram que uma mudança na CVF após 6 meses de acompanhamento é um factor de prognóstico independente da FPI. Estes dados evidenciam a importância das alterações a curto prazo nas PFR. E como Takahashi e colaboradores descreveram, essas alterações nas PFR podem ser previstas pelos níveis de SP-D numa fase inicial (antes da fibrose instalada), tornando-o num biomarcador de prognóstico(124) O tabagismo foi uma variável não controlada neste estudo, podendo ter exercido influência, justificando diminuição dos níveis de SP-A(124).

Takahashi, no mesmo estudo, sugeriu que após a produção de SP-A e SP-D, secretadas nos alvéolos, estas eram transferidas imediatamente para a circulação, e que a sua concentração no plasma aumenta na presença de alterações inflamatórias activas (alveolite), mas não na presença exclusiva de fibrose. Esta sugestão é consistente com a TC do tórax, em que a elevação sérica da SP-A e SP-D foi relacionada com o grau de opacidade em vidro despolido, mas não do padrão em favo de mel(124).

Noutro estudo de Takahashi e colaboradores(128) observou-se que as colectinas pulmonares são biomarcadores específicos para doenças deste foro. Uma vez que a expressão de SP-A e SP-D é abundante e exclusiva ao interior do pulmão, mudanças nos níveis destas proteínas

reflectem muito provavelmente alterações nas funções do epitélio alveolar. A determinação dos níveis séricos de SP-A e SP-D é não-invasiva e útil tanto para monitorização da actividade como para a previsão prognóstica da doença em DPI incluindo a FPI, DPI-DTC, pneumonite induzida por radiação, ARDS e proteinose alveolar pulmonar.

Yokoyama e colaboradores(129) demonstraram que os níveis de KL-6 podem prever a eficácia dos corticóides mais precocemente que outros biomarcadores estudados, e, previamente à melhoria clínica ser evidente. No entanto este estudo incluiu um pequeno número de doentes, e constatou-se que os níveis séricos de KL-6 anteriores ao início do tratamento não poderiam ser usados para prever o resultado. Os níveis séricos de KL-6 podem estar aumentados em certos processos tumorais(7, 14, 85). Estas representam as grandes limitações do uso deste biomarcador e evidenciam a necessidade de mais estudos.

Greene e colaboradores(130) demonstraram uma elevação dos níveis séricos de SP-A e SP-D em doentes com FPI e ES em comparação com os doentes com sarcoidose ou beriliose. Curiosamente, este estudo demonstrou que níveis aumentados de SP-A e SP-D são altamente preditivos de mortalidade na FPI e ES progressiva, o que os torna promissores para a avaliação do prognóstico (principalmente o SP-D)(7).

Yanaba e colaboradores(131) realizaram um estudo longitudinal retrospectivo num pequeno número de indivíduos com ES e descobriram que a maioria dos que apresentavam valores plasmáticos de KL-6 normais, não apresentaram deterioração ou desenvolvimento posterior de fibrose pulmonar (FP) enquanto os pacientes com aumento dos níveis séricos de KL-6 mostraram uma progressão da FP. O mesmo grupo fez ainda um estudo comparativo sobre a utilidade na monitorização do curso clínico entre KL-6 e SP-D concluindo que a combinação

dos dois biomarcadores parece ser mais útil do que a sua utilização isolada. O estudo foi inconclusivo devido à pequena dimensão da amostra(7, 132).

Ishii e colaboradores(133) estimaram os valores de diagnóstico de cinco biomarcadores pulmonares periféricos: SP-A, SP-D, KL-6 e dois biomarcadores tumorais SLX e CA19-9, na diferenciação de pacientes com DPI de padrões histopatológicos diferentes, tais como UIP e NSIP. Os autores encontraram diferenças nos doseamentos séricos de SP-A entre os dois grupos indicando esta proteína como apresentando potencial discriminativo. Embora este estudo mostre resultados promissores, é arriscado tentar estabelecer o diagnóstico diferencial destas patologias no quotidiano apenas por métodos não invasivos. O número de doentes incluído era pequeno e houve casos de alguma sobreposição dos níveis de SP-A nos doentes UIP e NSIP(7).

Kinder e colaboradores, num estudo recente, demonstraram que os níveis séricos SP-A no momento do diagnóstico de FPI são um forte indicador independente da sobrevivência, particularmente durante o primeiro ano de acompanhamento. Estes níveis podem identificar os doentes com doença mais activa e com maior risco de morte. No prosseguimento dos estudos seria importante esclarecer se medições seriadas de SP-A plasmática podem constituir um biomarcador mais específico de risco de mortalidade a longo prazo que as PFR(134). Os mesmos autores concluíram que a avaliação conjunta dos níveis de SP-A e SP-D é superior a cada uma individualmente(134).

Outros biomarcadores: CK19, Ca19-9, SLX

Outros biomarcadores têm sido explorados no sentido de compreender melhor a fisiopatologia destas doenças. Alguns dos mais extensivamente relatados foram o CK19, Ca 19-9 e SLX.

Dobashi e colaboradores foram os primeiros a demonstrar a presença de níveis séricos de CK19 elevados nas DPIs e uma associação significativa deste biomarcador com parâmetros clínicos preditivos da evolução (biomarcador de lesão pulmonar)(135). No entanto, mais estudos seriam necessários.

Nakayama e colaboradores[65] foram os primeiros a revelar uma relação positiva entre o aumento dos níveis séricos de CK19 e a baixa taxa de sobrevivência na FPI e DTC-DPI, sugerindo um papel potencial deste biomarcador tumoral em reflectir a gravidade da lesão pulmonar e o prognóstico. Este estudo permitiu concluir que este biomarcador não discrimina FPI de outras patologias com lesão epitelial.

O primeiro estudo a testar a utilidade clínica de níveis sanguíneos elevados de Ca 19-9 numa série de doentes com FP foi conduzido por Satoh e colaboradores(136). Os autores demonstraram uma forte correlação entre os níveis séricos e o grau de actividade da doença(137).

Satoh e colaboradores (138) estabeleceram um “cut-off” nos níveis séricos de SLX, com análises de *Western blot* e documentaram que esta combinação é de alto poder diagnóstico na diferenciação entre FPI e o adenocarcinoma pulmonar.

Nenhum dos estudos foi capaz de estabelecer valores de “cut-off” diagnóstico, foram todos caracterizados por baixa significância estatística, e na sua maioria, não se encontrou relação com a gravidade da doença. O KL-6 mostrou maior poder discriminativo que os antigénios dos hidratos de carbono. Por outro lado, o desconhecimento do papel destes biomarcadores na fisiopatologia das doenças limita a interpretação dos resultados. Neste sentido Obayashi e

colaboradores(139) reportaram correlação directa entre os níveis de Ca19-9 no LBA e a percentagem de neutrófilos. Este estudo sugere um potencial papel para o Ca19-9 como quimiotactico de neutrófilos e subseqüentemente implicação no processo de lesão pulmonar.

Outros biomarcadores: citocinas

Seguindo o objectivo, nos últimos anos, vários investigadores partiram para o estudo do envolvimento das citocinas nestas patologias(7).

Suga e colaboradores(140) concluíram que a elevação sérica e os níveis no LBA de MCP-1 poderiam ser úteis para discriminar FPI de outros membros do grupo das DPI. Curiosamente, as concentrações séricas do MCP-1 de pacientes com FPI submetidos a corticoterapia não revelaram tendência para cair com o tratamento. No entanto, esses resultados não provam nem a reprodutibilidade do biomarcador, nem a sua relação com o comportamento da doença. As últimas observações mostraram influência da corticoterapia nos níveis de MCP-1, fazendo deste biomarcador um mediador da inflamação. Como também é produzido noutras partes do corpo fica limitada a especificidade no diagnóstico diferencial e o seu valor como biomarcador precisa de reavaliação.

As citocinas, como indicadores dos efeitos terapêuticos de diversos fármacos contra a FPI, fornecem aos investigadores conhecimentos sobre os mecanismos potenciais desses fármacos em termos de fisiologia e biologia molecular, sublinhando novos alvos terapêuticos(7).

Strieter e colaboradores(141) estudaram os efeitos do IFN- γ 1b sobre alguns biomarcadores que se especulavam ser mediadores na patogénese da FPI. O achado mais importante desse estudo foi a elevação diferencial no sangue e no LBA, antes e após o tratamento, dos níveis de ITAC/CXCL-11, uma quimiocina com actividade multifuncional incluindo antiangiogénica e



antimicrobiana. Este estudo revelou que se poderia melhorar a mortalidade dos pacientes com FPI dadas as propriedades protectoras do IFN- γ 1b apoiando a sua utilidade terapêutica.

Análise simultânea de biomarcadores

Maiores concentrações séricas das proteínas do surfactante(130), KL-6(129), FAS(142), CCL-2(140), defensinas e SPP1(143) foram relatadas em pacientes com FPI e outras DPI, mas a maioria destes estudos contou com um pequeno número de doentes e ensaiou apenas um único ou alguns biomarcadores em simultâneo. Rosas e colaboradores(144) utilizaram um sistema de análise simultânea de diversas proteínas e analisaram as concentrações de 49 proteínas plasmáticas, incluindo citocinas, quimiocinas, factores de crescimento e de angiogénese, MMPs e biomarcadores de apoptose num estudo de coorte de derivação composta de pacientes com FPI e controlos saudáveis. Os autores identificaram uma fórmula combinatória de cinco proteínas. Estudaram 4 grupos de doentes (com FPI, sarcoidose, DPOC (doença pulmonar obstrutiva crónica) e PH).

As MMP7 e MMP1, previamente implicadas na patogénese da FPI(145), estão significativamente aumentadas no plasma, LBA e tecido pulmonar de pacientes com FPI, sugerindo que o seu aumento no sangue periférico é indicativo das alterações patológicas que caracterizam o microambiente alveolar na FPI. É observado um aumento das concentrações sanguíneas de MMP7 em pacientes com FP subclínica familiar. Níveis elevados de MMP7 estão relacionados com a gravidade da doença. Os resultados de Rosas e colaboradores suportam o uso das MMP1 e MMP7 como biomarcadores na FPI e sugerem que o seu papel no diagnóstico precoce e monitorização da progressão da doença deveria ser explorado.

Apesar de vários papéis diferentes e por vezes contraditórios terem sido propostos para o papel destas proteases nas DPI, o consenso é de que esta família de enzimas que degradam a

matriz está envolvida na patogenia destas doenças(145-150). Estas duas principais proteínas referidas estão significativamente aumentadas no epitélio alveolar pulmonar na FPI. A MMP1, que degrada principalmente colagénio fibrilar, raramente se expressa em condições normais(150) e a MMP7 é uma metaloproteinase da matriz com múltiplos papéis reguladores da inflamação local(151, 152). Ambas são altamente expressas (sobre expressa no caso da MMP7) em células epiteliais alveolares reactivas em pulmões com FPI(153, 154).

Fica assim apoiada a utilização destas proteases como biomarcadores para detecção da doença e monitorização da progressão da FPI.

Rosas e colaboradores(144) mostraram que nem os pacientes com DPOC, nem os pacientes com sarcoidose expressam concentrações periféricas de MMP1 ou MMP7 significativamente aumentadas. Isto demonstra que as concentrações sanguíneas periféricas de MMP7 e MMP1 observadas na FPI não são devidas a uma resposta sistémica relacionada com uma doença pulmonar crónica. E potencialmente poderão distinguir a FPI de doenças como a DPOC, sarcoidose ou PH.

Numa visão crítica aos resultados de Rosas e colaboradores, o facto de existirem níveis elevados de MMP7 em estádios subclínicos da doença pode ser indicativo que estes níveis possam estar assim presentes noutras DPI. E neste contexto, a elevação da sua concentração pode sugerir a MMP7 como um biomarcador para DPI assintomática precoce. Refere-se ainda o facto de que os padrões de expressão génica de MMP7 no LBA e no sangue parecem ser muito semelhantes na FPI e na NSIP(155-157).

Se validados, estes biomarcadores têm o potencial para facilitar a introdução de novas terapêuticas para a FPI.

Outros estudos, encontraram níveis aumentados de citocinas e quimiocinas no LBA de doentes com FPI(158). Os níveis de várias quimiocinas (CC), CCL 2, CCL 17 e CCL 22 no LBA sugeriram um mau prognóstico em pacientes com FPI(159).



Doenças pulmonares ocupacionais

Introdução

As doenças pulmonares ocupacionais (DPO) estão relacionadas com a exposição e inalação de partículas orgânicas, inorgânicas, sintéticas, fumos, gases ou agentes infecciosos, o que pode ocorrer no local de trabalho ou outras ocupações. A identificação desta exposição torna crucial a realização de uma história clínica detalhada.

Borm(160) salientou a necessidade de métodos para monitorizar o início dos efeitos adversos da exposição e/ou a susceptibilidade dos indivíduos sujeitos à exposição potencialmente nociva. A incapacidade relativa das modalidades actuais incluindo anamnese, exame físico e as PFR para detectar sinais precoces dos efeitos adversos das exposições estimulou o interesse em utilizar alterações de base molecular, bioquímicas e patológicas como indicadores de doença respiratória(150).

Da multiplicidade de patologias existentes, abordam-se nesta revisão aquelas com envolvimento imunoinflamatório do parênquima: PH e pneumoconioses(161).

O LBA é uma ferramenta útil para o estudo destas patologias, quer na exclusão de outras causas de alveolite, quer no seu diagnóstico, na identificação de corpos asbestósicos na abestose ou de uma resposta proliferativa de linfócitos no LBA do doente com beriliose.

Vários estudos têm sido projectados para utilizar os biomarcadores de exposição, susceptibilidade e alterações fisiopatológicas, como parte da matriz de ferramentas disponíveis para avaliar a doença ambiental.

A actividade e libertação de vários mediadores inflamatórios como o TNF- α , enzimas antioxidantes (glutaciona), peptídeos do procolagénio (tipo III) e biomarcadores de lesão

celular, tal como a lactato desidrogenase (LDH) têm vindo a ser avaliados como ferramentas de avaliação do desenvolvimento da doença, actividade, progressão e prognóstico em várias patologias ocupacionais e ambientais.



Pneumonite de hipersensibilidade

A PH, também designada alveolite alérgica extrínseca, é uma doença granulomatosa e inflamatória do interstício pulmonar causada pela inalação intensa ou repetida de poeiras orgânicas com sensibilização.

Etiologia

Actualmente estão descritos mais de 200 agentes responsáveis pela PH, incluindo produtos de origem animal e vegetal, microrganismos em aerossóis e produtos químicos orgânicos, geralmente com diâmetro inferior a 3 a 5 μm para que sejam inalados e alcancem a periferia do pulmão(161, 162).

Epidemiologia

A prevalência de PH está relacionada com diversos factores tais como o tipo, a intensidade e a duração da exposição, a concentração e solubilidade do antigénio, o tamanho das partículas, e a susceptibilidade do indivíduo. Estima-se que na população exposta a prevalência se situe entre 5 e 15%(163), apesar de uma percentagem superior de doentes poderem apresentar hipersensibilidade sem doença, como acontece com 40% dos criadores de pombos(161, 164).

Patogenia

Os antigénios, uma vez dentro das estruturas alveolares podem induzir respostas imunes celulares e humorais. O conhecimento adquirido sobre esses mecanismos é, em grande parte, proveniente do estudo do LBA.

Tipicamente o LBA mostra um padrão de alveolite intensa na PH com clara predominância dos linfócitos, frequentemente atingindo percentagens superiores a 50%(162) e geralmente com uma relação CD4/CD8 abaixo do normal. Muitas vezes conta com a presença de mastócitos, plasmócitos e macrófagos espumosos(161).

Esta alveolite linfocítica é critério major de diagnóstico na ausência de confirmação histológica(161).

Biomarcadores da PH

Wolff e seus colaboradores(165) descreveram como a fibronectina e o factor de crescimento transformador- β (TGF- β) estão significativamente aumentados em pacientes com PH em comparação com pacientes com pneumonia eosinofílica, alveolite fibrosante criptogênica e sarcoidose, o que se relaciona possivelmente com uma maior intensidade da inflamação na PH. O interferão gama (INF- γ) está significativamente diminuído na PH em comparação com a sarcoidose, provavelmente devido ao balanço Th2 vs Th1 em ambas as doenças.

O diagnóstico de PH é feito com base na história de ocorrência de queixas, por períodos ou permanentemente, aquando da exposição a um antígeno específico por inalação, pela identificação de alterações intersticiais em ambos os pulmões na radiografia do tórax ou TCAR e detecção de anticorpos precipitantes. Actualmente, os procedimentos disponíveis para a confirmação do diagnóstico são invasivos e dispendiosos para o uso quotidiano.

Nesse sentido Takahashi e colaboradores(166) avaliaram os níveis séricos de KL-6 como um biomarcador biológico para a doença de pulmão do fazendeiro, um tipo de PH causada pela inalação de antígenos bacterianos presentes no feno, frequente na actividade agrícola. Realizaram assim um estudo de coorte que claramente demonstrou níveis séricos de KL-6

significativamente aumentados nos pacientes com pulmão do fazendeiro comparativamente a outros agricultores, independente de apresentarem pesquisa de precipitinas positivas.

As principais conclusões do estudo foram no entanto a correlação encontrada entre os níveis séricos de KL-6 e a actividade da doença, bem como a indicação de que elevadas concentrações deste biomarcador, aliadas aos critérios convencionais de diagnóstico podem detectar estádios subclínicos da doença permitindo uma terapêutica mais precoce e eficaz.

No entanto, para validar esta correlação seria necessária uma avaliação aprofundada da especificidade e da sensibilidade deste biomarcador, assim como a análise da sua relação com o comportamento da doença(7).

Pneumoconioses

As pneumoconioses são doenças pulmonares intersticiais crónicas causadas pela inalação de minerais metálicos e partículas inorgânicas ou poeiras num contexto ocupacional(161).

Epidemiologia

Actualmente parece existir uma tendência para mudança na prevalência das várias doenças ocupacionais com queda da incidência das pneumoconioses e um aumento da asma ocupacional(161, 167). Este facto relaciona-se com contínuas melhorias ao nível tecnológico e melhores medidas de higiene e segurança no trabalho.

Fisiopatologia

A inalação de agentes como a sílica cristalina pode conduzir a lesões reactivas do pulmão levando a fibrose pulmonar. Como as restantes patologias por exposição ocupacional, o desenvolvimento e evolução da patologia relacionam-se com diversos factores incluindo a duração da exposição, a concentração de partículas no ambiente e suas características morfológicas, físico-químicas e de superfície para além da susceptibilidade individual(161).

A fisiopatologia das pneumoconioses é complexa. Primeiramente caracteriza-se pela intervenção dos macrófagos e células NK junto das partículas inaladas. De seguida ocorre opsonização das partículas por surfactante, imunoglobulinas, componentes do complemento entre outras. Estas mudanças podem ser expressas no LBA (e na biópsia) por alveolite linfocítica e ocasionalmente neutrofília ou um padrão misto. Geralmente ocorre activação preferencial de linfócitos T CD4 ou CD8 e diferenciação Th1/Th2 induzindo a progressão

para uma reacção granulomatosa ou para fibrose, com a activação das IL-1,4,6,8,10,12, e 13, TNF- α , MMP-1, TIMP-1, ICAM-1, TGF- β , EGF, IGF, PDGF, entre outros(161, 168).

Beriliose

A doença crónica do berílio (DCB), ou beriliose, é uma doença pulmonar granulomatosa que afecta 1 a 3% dos trabalhadores expostos a este elemento e é clínica, radiológica e histologicamente indistinguível da sarcoidose(161, 169, 170).

O LBA permite esclarecer o perfil imunopatogénico da doença (perfil de células T CD4 com diferenciação em Th1 eventualmente regulada por um HLA particular, alelo DPB1(161, 171)). Mas o LBA revela-se aqui também como uma ferramenta de diagnóstico mostrando a proliferação de linfócitos que ocorre em resposta ao berílio. Este teste de transformação linfocitária, quantificando a proliferação de linfócitos incubados com sais de berílio, é sempre positivo em pacientes com DCB desde que sejam usados linfócitos provenientes do LBA mas apenas positivam em 50% dos casos se os linfócitos usados forem provenientes do sangue periférico(172). Assim o LBA é a ferramenta mais sensível para identificar a doença.

Uma análise retrospectiva em 20 pacientes com pneumoconioses de diferentes etiologias realizada no Centro de Pneumologia da Universidade de Coimbra revelou uma alveolite menos intensa quando comparada com a PH, com um alveolite mista linfocítica/granulocítica(161).

Biomarcadores nas pneumoconioses

Borm e colaboradores(160, 173) avaliaram a utilidade clínica das enzimas antioxidantes, do TNF- α e do peptídeo pró-colágeno do tipo III sérico em pacientes com patologia induzida pela poeira de carvão, um amplo espectro de doenças crónicas que incluem inflamação e fibrose maciça progressiva (FMP). No primeiro estudo de caso-controlo realizado foram encontrados níveis de glutathione diminuídos no soro de pacientes com pneumoconiose em estádios iniciais, no entanto, aumentados nos pacientes com FMP induzida pelas poeiras de carvão(7, 160). Este achado sugere um papel potencial das enzimas anti-oxidantes na detecção precoce da resposta inflamatória associada à exposição a poeiras minerais. Os níveis de glutathione não são úteis para predizer a susceptibilidade do indivíduo pois parecem reflectir uma consequência da doença. Perante isto os autores realizaram um segundo estudo caso-controlo dirigido para o TNF- α como um potencial factor de risco. Concluiu-se que a libertação de TNF- α pelos monócitos do sangue periférico em trabalhadores expostos á poeira de minas de carvão é um biomarcador de susceptibilidade individual para fibrose pulmonar induzida por poeiras(7, 173). Em estudos posteriores estes achados foram corroborados(174, 175) e foi apoiada a noção de que o TNF- α libertado pelos monócitos não está associado com a exposição real ou cumulativa.

Um estudo prospectivo neste contexto poderia ser esclarecedor. Schins e colaboradores(176), mostraram prospectivamente que os mineiros que tiveram progressão da doença durante cinco anos já tinham níveis elevados de TNF- α libertado pelos monócitos quando expostos a poeira do carvão no início do estudo e não foram registadas alterações no seguimento. Este estudo veio provar que o TNF- α não é biomarcador de exposição e sugeriu que a libertação desta citocina é um biomarcador do prognóstico que não é afectado pela doença em si.

Tendo como alvo o peptídeo do procolagénio tipo III, Schins e Borm(177) realizaram um outro estudo prospectivo de 5 anos no qual não foram observadas diferenças entre os níveis

séricos deste biomarcador em mineiros de carvão e controlos não-expostos, concluindo-se que este peptídeo não é um biomarcador de risco precoce.

Cobben e colaboradores(178, 179) estudaram o papel da LDH como biomarcador de lesão do tecido pulmonar. Descreveram uma elevação considerável deste enzima num grupo de ex-mineiros e uma associação com outras variáveis clínicas. Avaliaram noutro estudo o papel da β -glucuronidase como biomarcador da actividade fagocitária e relataram concentrações plasmáticas aumentadas num grupo de mineiros de carvão após 20 anos de exposição, no entanto sem correlação com a gravidade clínica. Os dados mais recentes indicam a LDH e a β -glucuronidase como biomarcadores possíveis da actividade da doença. Estes estudos devem ser cuidadosamente interpretados e são necessários estudos prospectivos para explorar estes achados.

Enquanto o papel da neopterin permanece por esclarecer, Harris e colaboradores(180), exploraram-na como potencial biomarcador na DCB pela sua utilidade para reflectir a activação de monócitos e macrófagos que conduz à doença. Neste estudo, usando curvas ROC, os autores encontraram uma associação entre níveis séricos de neopterin e parâmetros clínico-laboratoriais de gravidade da doença. Sugeriram este biomarcador para discriminar trabalhadores com DCB daqueles que estão apenas sensibilizados ao berílio de forma a tornar desnecessária a biópsia para este fim.

Estes estudos foram sustentados por testes in-vitro com células mononucleares de sangue periférico de pacientes com DCB ou de trabalhadores expostos a berílio(25) tendo sido encontrada uma associação entre os níveis séricos de neopterin e os parâmetros clínico-laboratoriais da gravidade da doença.

No entanto, são necessários estudos de coorte em grande escala incluindo medições seriadas e a sua correlação com critérios clínicos e radiológicos para determinar os níveis de “cut-off” para o diagnóstico da doença e conhecer a probabilidade da sua progressão.



Biomarcadores noutras patologias do interstício pulmonar

Como as proteínas do epitélio pulmonar reflectem o dano pulmonar e a sua renovação celular foi recentemente demonstrado que elas podem ser usadas como biomarcadores circulantes efectivos para o diagnóstico, prognóstico e curso clínico de vários tipos de pneumonites intersticiais incluindo as induzidas por fármacos, por radiação e de hipersensibilidade.

Pneumonite induzida por fármacos

Muitos agentes, citotóxicos ou não, para o pulmão, têm capacidade de exercer toxicidade pulmonar possivelmente fatal.

Ohnishi e colaboradores(181) numa tentativa de encontrar um biomarcador reprodutível capaz de reconhecer lesão pulmonar induzida por diferentes tipos de fármacos, estimou as concentrações plasmáticas de KL-6 em 30 doentes com pneumonite associada a fármacos classificando-os segundo quatro tipos de padrões radiográficos. A constatação notável deste estudo foi a demonstração de uma relação sensível entre a elevação dos níveis plasmáticos de KL-6 e tipos específicos de lesão pulmonar, bem como com seu curso clínico. No entanto, o reduzido número de pacientes e as discrepâncias entre os níveis séricos de KL-6 e a extensão da doença (definido pela TC) constituem factores que restringem a possibilidade de conclusões mais práticas indicando a necessidade de mais estudos para determinar se a monitorização do KL-6 é útil e se este biomarcador pode ser eficaz para a detecção precoce da doença(7).

Pneumonite induzida por radiação

A pneumonite induzida pela radiação, utilizada para tratamento de neoplasias, é classificada como uma DPI. O seu diagnóstico é baseado sobretudo na TC, que no entanto nem sempre é reprodutível e por vezes exhibe padrões não específicos, muito difíceis de distinguir de manifestações tumorais. Um teste laboratorial reprodutível é assim necessário para a detecção precoce da lesão pulmonar associada à radiação(7).

Kohno e colaboradores(182) neste sentido estudaram os níveis séricos de KL-6 como um possível biomarcador sensível da pneumonite rádica grave. Não foi no entanto possível retirar conclusões pois o número de medições efectuadas durante o curso clínico dos pacientes em estudo foi reduzido. Goto e colaboradores(183) no seguimento deste estudo fizeram medições seriadas em curtos espaços de tempo dos níveis séricos de KL-6 em pacientes com cancro do pulmão que foram sujeitos a radioterapia com ou sem quimioterapia concomitante e mostraram uma relação entre o curso clínico da pneumonite induzida pela radiação e a resposta ao tratamento.

A constatação que os níveis séricos de KL-6 em alguns pacientes se encontravam aumentados mesmo antes do diagnóstico clínico e radiológico de pneumonite de radiação é particularmente notável e deve ser considerada.

Takahashi e colaboradores(184) demonstraram que quase todos os pacientes com pneumonite induzida pela radiação, diagnosticados por TC, apresentavam níveis séricos de SP-A e SP-D elevados, mostrando uma alta especificidade e sensibilidade para um diagnóstico precoce quando comparados com outros índices laboratoriais utilizados. Também foi encontrada uma relação entre os níveis de SP-A e SP-D e a resposta clínica ao tratamento com esteróides. Estes dados sugerem um possível papel das proteínas específicas epiteliais do pulmão como uma ferramenta diagnóstica para o reconhecimento de lesão pulmonar induzida pela radiação mesmo quando as suas manifestações radiográficas são frustrantes.

Os estudos referidos têm várias deficiências, como o número reduzido de pacientes envolvidos, a aplicação de quimioterapia concomitante à radioterapia, a ausência de medições seriadas durante a evolução da doença e ainda a evidência de que estes biomarcadores (KL-6 e SP-A) não são específicos de órgão nem de doença dado que também foram encontradas alterações no adenocarcinoma do pulmão(7, 85, 185).



Contributo pessoal: trabalho de investigação**Expressão de perfis de marcadores inflamatórios na patologia intersticial pulmonar**

Brigite Ferreira¹, Luís Mesquita^{2,3}, Tiago Alfaro³, Henriqueta C Silva^{2,3}, Carlos R Cordeiro³

¹Aluna do Mestrado Integrado em Medicina da FMUC; ²Unidade de Genética Médica da FMUC; ³Centro de Pneumologia da FMUC.

Trabalho financiado pelo Centro de Pneumologia

Objectivos

Mediante o estudo da expressão de moléculas envolvidas na resposta imunoinflamatória procurámos compreender melhor a patogénese das DPI e identificar biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico. Os objectivos do trabalho consistem em:

- procurar padrões de resposta inflamatória com vista a um auxílio diagnóstico às patologias do interstício, através de métodos menos invasivos;
- identificação de biomarcadores imunoinflamatórios para avaliação prognóstica;
- identificação de critérios para o desenvolvimento de protocolos individualizados de imunomoduladores;
- identificação de biomarcadores para seguimento de protocolos terapêuticos de imunomoduladores;

Métodos

Estudaram-se 32 doentes com patologia intersticial do pulmão e 49 controlos. Quantificou-se a expressão de 30 genes pela técnica de MLPA (multiple ligation probe assay), com o kit “SALSA MLPA kit R009 Inflammation mRNA”, no sangue periférico e no LBA dos doentes e no sangue periférico dos controlos. Esta técnica permite o estudo quantitativo

de dezenas de sequências de RNA ou DNA em simultâneo. As sequências são identificadas por sondas marcadas com comprimentos específicos e são separadas por electroforese capilar num sequenciador automático. A intensidade do sinal vai ser proporcional ao número de cópias da sequência alvo. Foi utilizado o gene PARN como gene controlo. Os genes estudados encontram-se listados na tabela 1.

IL15-R01	Interleucina 15
IL4-R02	Interleucina 4
NFKBIA-R01	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
NFKB1-R01	Factor nuclear KB
IFNG-R01	Interferão- γ
TNF-R01	Factor de necrose tumoral - α
IL18-R01	Interleucina 18 (Factor de indução INF- γ)
IL1B-R01	Interleucina 1 β
IL1RN-R01	Antagonista do receptor da interleucina 1
IL2-R01	Interleucina 2 (Factor de crescimento das células t)
IL6-R01	Interleucina 6
IL8-R01	Interleucina 8
IL10-R01	Interleucina 10
IL13-R01	Interleucina 13
IL12A-R01	Interleucina 12A (subunidade p35)
IL12B-R01	Interleucina 12B (subunidade p40)
B2M-R01	microglobulina β 2
NFKB2-R01	Factor nuclear KB (subunidade 2)
SERPINB9-01	Proteína inibidora da cisteína

PDGFB-R01	Factor de crescimento derivado das plaquetas
THBS1-R01	Trombospondina 1
LTA-R01	TNF- β
CDKN1A-R01	P21
TNFRSF1A-01	Receptor do TNF 1
BMI1-R01	Oncogene BMI-1
MIF-R01	Factor inibidor da migração dos macrófagos
SCYA2-R01	Proteína quimiotática dos monócitos 1
SCYA4-R01	Proteína inflamatória dos macrófagos 1 β
SCYA3-R01	Proteína inflamatória dos macrófagos 1 α
SCYA8-R01	Proteína quimiotática dos monócitos 2

Tabela 1 - Tabela de biomarcadores estudados.

Recrutamento de doentes

Os doentes foram recrutados no Serviço de Pneumologia dos HUC, entre os doentes referidos para a realização de broncofibroscopia no seguimento da sua orientação clínica. Foram incluídos doentes com patologia intersticial diagnosticados segundo as *guidelines* mais recentes(2, 33). Os doentes sem diagnóstico definitivo foram incluídos no grupo geral de doentes. O grupo “outras doenças pulmonares intersticiais” contava com doentes com patologia intersticial não incluída nos grupos supra-referidos, diferente dos restantes subgrupos.

Os subgrupos foram assim definidos: sarcoidose (n=7), PH (n=3), FPI (n=2), DTC (n=3), outras (n=6).

O subgrupo “outras” inclui pacientes com patologia intersticial diferente das dos restantes grupos (OP – pneumonia em organização, ACIF - airway-centered interstitial fibrosis – fibrose intersticial centrada nas vias aéreas, e silicatose). Alguns doentes não foram inseridos nos subgrupos por não ter sido possível estabelecer ainda o diagnóstico definitivo, sendo apenas considerados para o grupo geral doentes.

Os dados relativos ao tratamento, hábitos tabágicos e contagem total e diferencial de células no LBA não foram incluídos na análise por indisponibilidade dos mesmos em tempo útil. Salienta-se que se trata de um projecto ainda em curso.

Estudo estatístico

A análise estatística foi efectuada utilizando testes de ANOVA para as amostras com distribuição normal. Para as amostras com distribuição não normal usou-se U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e o teste pos-hoc de Dunn. Utilizou-se o SPSS na realização do teste ANOVA entre os grupos controlos e doentes e o GraphPad versão 5 na análise dos subgrupos.

Fez-se o estudo comparativo entre os níveis encontrados no sangue do grupo doente vs grupo controlo. Quando esta análise revelou diferenças significativas realizou-se o estudo comparativo entre os subgrupos de doentes.

Resultados

O estudo do LBA não revelou diferenças com significância estatística tendo sido inconclusivo.

O estudo comparativo entre os grupos doentes vs controlos revelou dados com significância estatística para os seguintes genes: NFKB2-R01, SERPINB9-R01, THBS1-R01, CDKN1A-R01, BMI1-R01, MIF-R01, SCYA2-R01, SCYA4-R01 e SCYA3-R01.

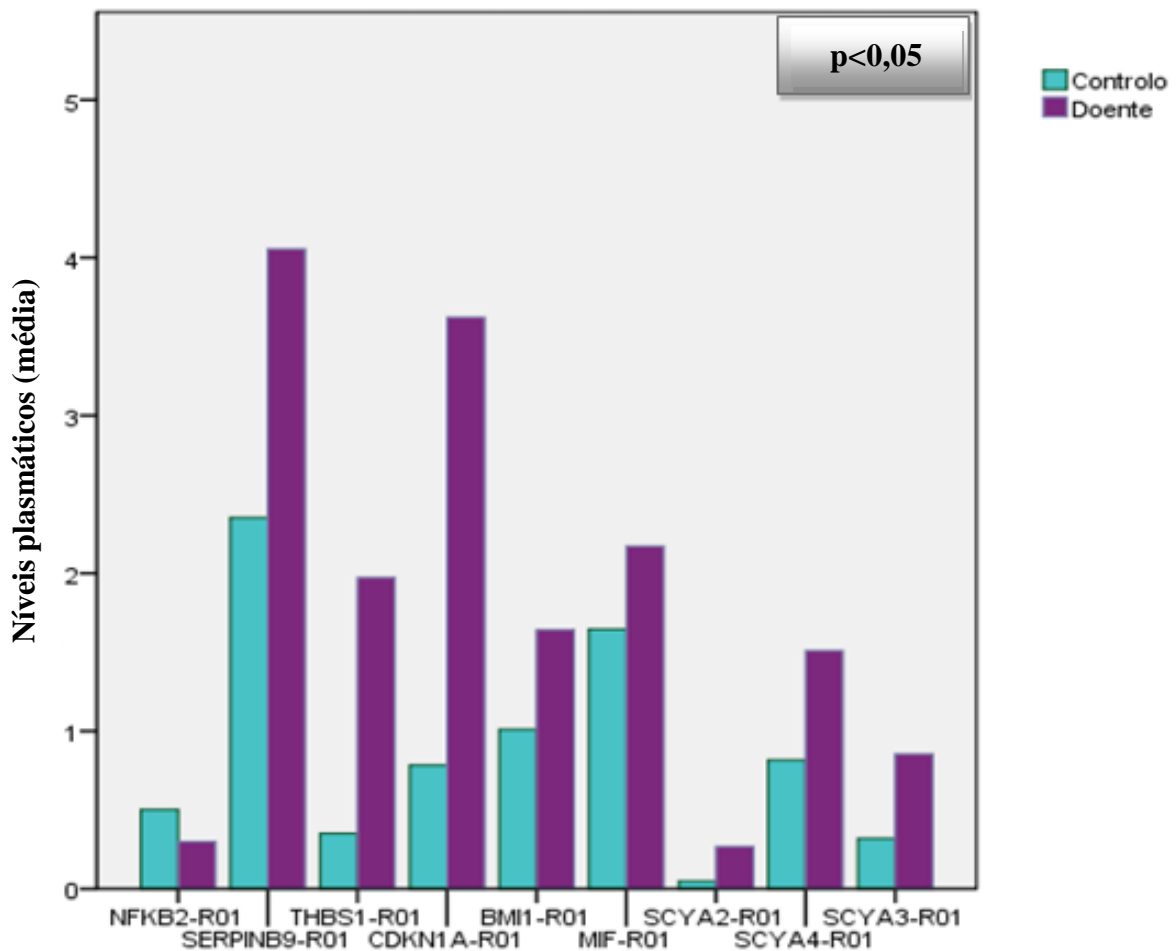


Ilustração 10 - Níveis plasmáticos doentes vs controlos ($p < 0,05$).

O estudo comparativo entre os subgrupos de doentes é apresentado nos seguintes gráficos.

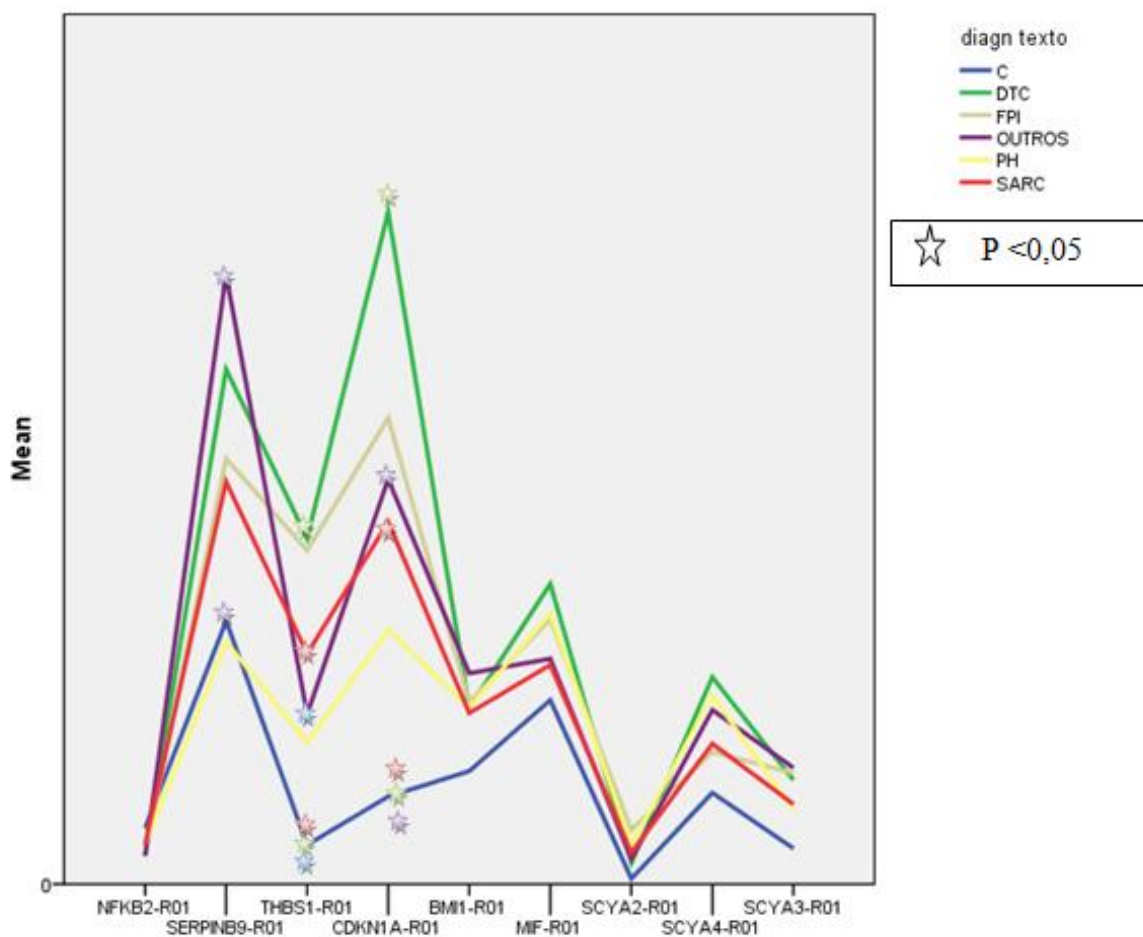


Ilustração 11 - Estudo comparativo entre os subgrupos de doentes. Os pares de estrelas com a mesma cor revelam significância estatística na distinção dos respectivos subgrupos assinalados (p<0,05).

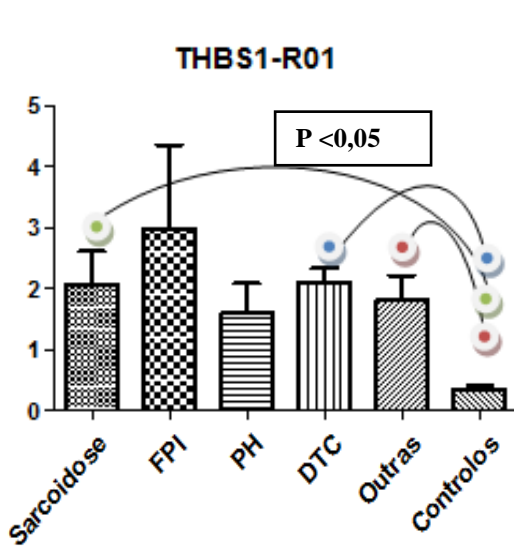


Ilustração 12 – THBS1-R01. Revelou significância estatística na distinção entre os grupos Controlos vs Sarcoidose, Controlos vs DTC e Controlos vs Outras ($p < 0.05$).

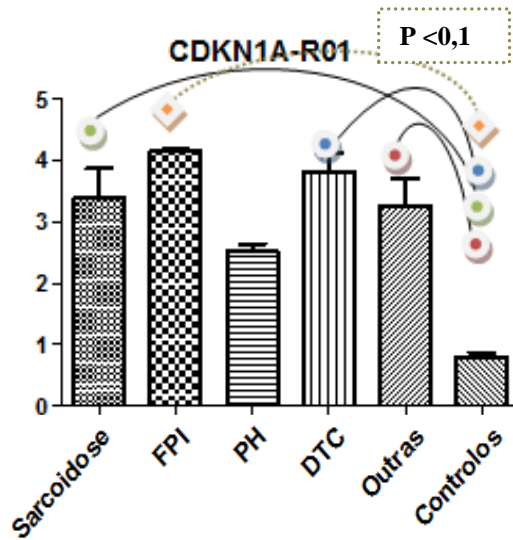


Ilustração 13 – CDKN1A-R01. Revelou significância estatística na distinção entre os grupos Controlos vs Sarcoidose, Controlos vs DTC e Controlos vs Outras ($p < 0.05$). E, ainda que sem significado estatístico, revelou-se próximo na distinção de FPI e Controlos ($p < 0.01$).

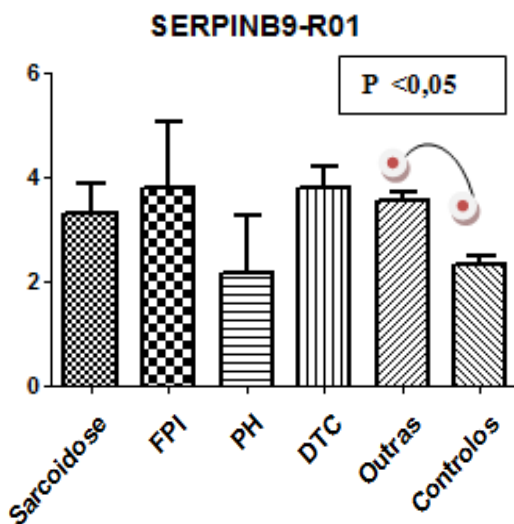


Ilustração 14 – SERPINB9-R01. Revelou significância estatística na distinção entre os grupos Controlos e Outras ($p < 0.05$).

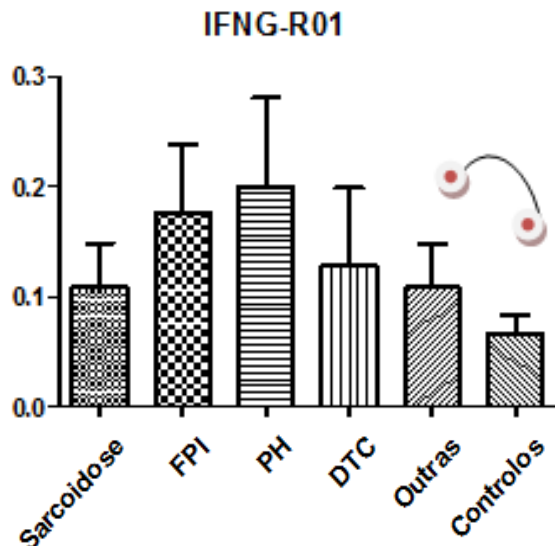


Ilustração 15 – IFNG-R01. Revelou significância estatística na distinção entre os grupos Controlos e Outras ($p < 0.05$).

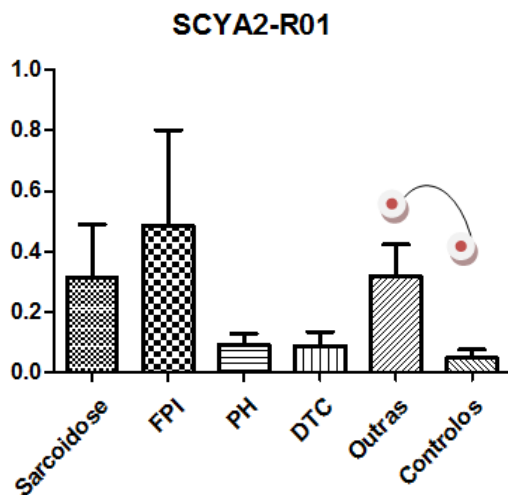


Ilustração 16 – SCYA2-R01. Revelou significância estatística na distinção entre os grupos Controlos e Outras ($p < 0,05$).

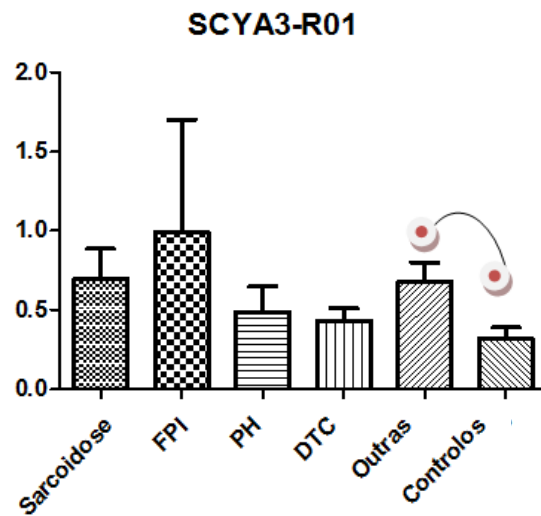


Ilustração 17 – SCYA3-R01. Revelou significância estatística na distinção entre os grupos Controlos e Outras ($p < 0,05$).

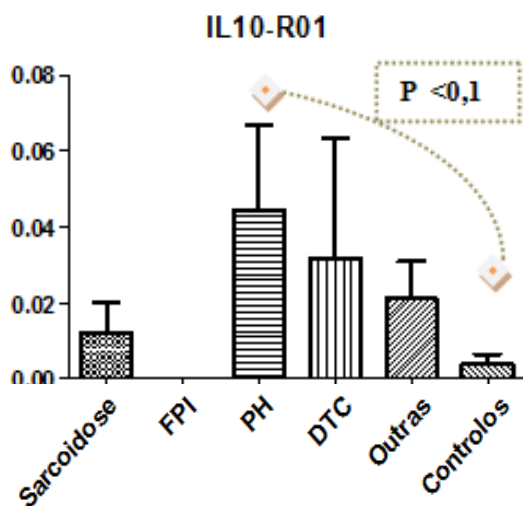


Ilustração 18 – IL10-R01. Ainda que sem significância estatística revelou potencial na distinção entre os grupos PH e Controlos ($p < 0,01$).

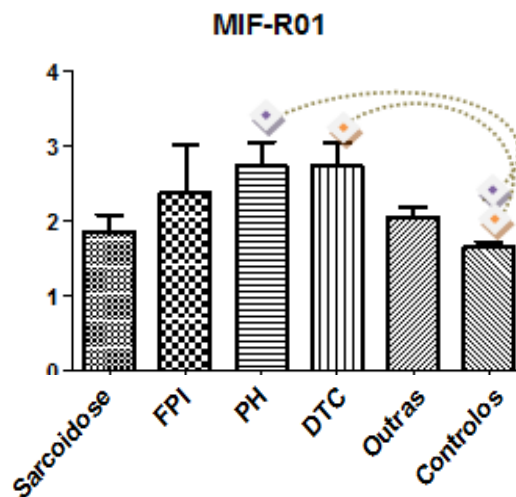


Ilustração 19 – MIF-R01. Ainda que sem significância estatística revelou potencial na distinção entre os grupos Controlos vs PH e Controlos vs DTC ($p < 0,01$).

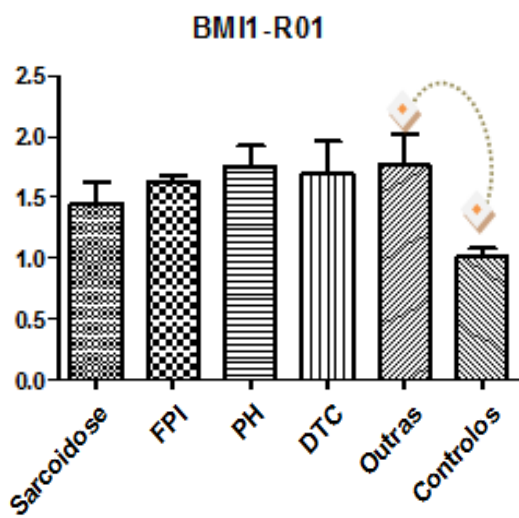


Ilustração 19 – BMI1-R01. Ainda que sem significância estatística revelou potencial na distinção entre os grupos Controlos e Outras ($p < 0,01$).

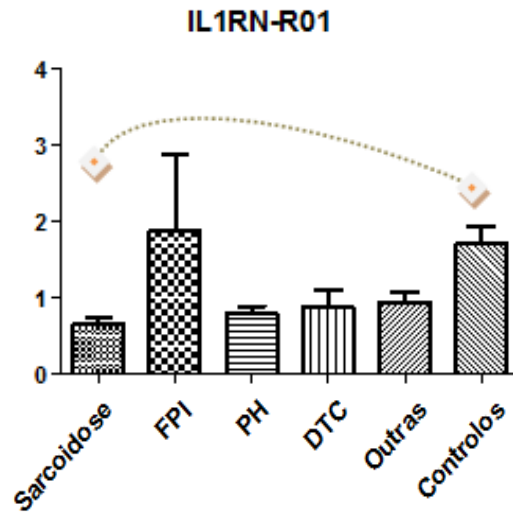


Ilustração 19 – IL1RN-R01. Ainda que sem significância estatística revelou potencial na distinção entre os grupos Controlos e Sarcoidose ($p < 0,01$).

Discussão

Relativamente ao LBA, não estão disponíveis dados de controlos e a amostra nos subgrupos de doentes contava com um n reduzido. Os resultados não apresentaram significância estatística, sendo inconclusivos. Provavelmente, a continuação do estudo e o aumento da amostra poderão trazer maior relevância aos valores encontrados.

Quanto à análise do sangue, vários biomarcadores se revelaram biomarcadores de doença.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas, ente os voluntários saudáveis e os doentes, em 9 biomarcadores.

O NFkB2-R01 encontrou-se significativamente diminuído no grupo de doentes relativamente aos controlos. O NFkB é um factor de transcrição que actua como proteína anti-apoptótica(186). Foi demonstrado que é libertado em consequência de *stress* oxidativo(187) e está aumentado em macrófagos alveolares e monócitos de doentes com sarcoidose activa(91). Jinta e colaboradores(188) sugeriram que um aumento de células epiteliais apoptóticas estava relacionado com o aumento de lesão fibrótica. A diminuição da expressão desta proteína no sangue favorece a apoptose. Portanto, estes dados vão de encontro com a sugestão de Jinta. Será o NFkB um bom biomarcador de progressão para fibrose? No nosso estudo não obtivemos diferenças com significância estatística inter-grupos, provavelmente pela pequena dimensão dos mesmos.

Salienta-se o conjunto de biomarcadores envolvidos na regulação do ciclo celular como o CDKN1A, o THBS1, o BMI1 e a SERPINB9 e o NFkB associados ao controlo da apoptose. Seria importante perceber as implicações desta desregulação do controlo do ciclo celular e da possível evolução destas patologias para cancro. No futuro seria importante fazer um estudo de seguimento dos casos e perceber o risco desta evolução.

O BMI-1 parece ter um papel importante na diferenciação em Th2(189). Encontra-se significativamente aumentado nos doentes sugerindo um estágio inflamatório. Com o continuar do estudo e a possível subdivisão dos subgrupos segundo o grau de actividade da doença, poder-se-ão encontrar resultados interessantíssimos como por exemplo: o BMI-1 poderia estar relacionado com o estágio inflamatório na sarcoidose e sinalizar a transição da resposta Th1 para a resposta Th2.

Curiosamente não obtivemos significância estatística para biomarcadores tão importantes como as ILs-2, 12, 4, 10 e 13.

A IL-13 foi apenas doseável em dois controlos, sendo o seu doseamento zero em todas as restantes medições. Park tinha encontrado uma relação entre o aumento do doseamento desta interleucina e a gravidade da FPI no que respeita à sua evolução para fibrose(104). Poderá ter existido um erro técnico neste doseamento. No entanto, estes resultados são significativos, pois os estudos de Park dosearam a citocina enquanto os nossos estudo dosearam o mRNA que a codifica. Basta que o turnover do mRNA seja muito rápido para que os seus níveis sejam praticamente indetectáveis. O mesmo aconteceu com as interleucinas -2, -6, -10, e -12.

O SCYA2 ou MCP1 mostrou-se significativamente elevado nos doentes, mas o mais interessante, é que o seu aumento, ainda que sem significância estatística, é superior na FPI o que está de acordo com o que Suga e colaboradores publicaram(140). Nesse mesmo estudo os autores sugeriram que esta proteína poderia ser útil para distinguir a FPI de outras DPI e para monitorizar a evolução das DPI.

O SCYA4 e SCYA3 ou respectivamente MIP1B e MIP1A sugerem a activação e quimiotaxia dos macrófagos e poderão ser úteis como biomarcadores de doença, no entanto, não revelaram diferenças com significância estatística na discriminação intergrupos.

A THBS1 mostrou significância estatística na distinção entre o grupo de controlos e cada um dos seguintes subgrupos: sarcoidose, DTC e outras. Curiosamente não mostrou significância na FPI e PH, que são os subgrupos mais pequenos. O aumento da amostra poderá alterar estes resultados. Um dado curioso é o facto do CDKN1A distinguir os mesmo grupos que a THBS1, no entanto, ao aplicar o teste estatístico mais permissivo, para um $p < 0,1$ também o subgrupo IPF se distingue dos controlos. O que parece ser um dado a favor.

O aumento de CDKN1A relaciona-se com o aumento da apoptose nas células do epitélio pulmonar e a sua expressão está aumentada nos pacientes com UIP relativamente aos pacientes com NSIP(188). Se atentar-mos à ilustração 13 (gráfico do CDKN1A), a FPI é a que revela o nível mais alto deste biomarcador, com um desvio padrão pequeno. E apesar de não revelar diferença estatisticamente significativa entre esta e os controlos, é muito provável que o que impede este significado estatístico seja o facto do n da FPI ser muito pequeno.

A maior parte dos biomarcadores revelou diferenças significativas entre os subgrupos "outras" e "controlos" provavelmente porque estes eram os que contavam com maior número de doentes.

A diferença entre os valores médios de IFN-gama do grupo de doentes e do grupo de controlos não foi estatisticamente significativa, mas parece haver uma tendência para valores mais altos nos doentes ($p=0,071$) o que sugere um padrão de resposta Th1 predominante.

O aumento do número de doentes, o controlo de variáveis como o tabagismo e a terapêutica prévia e a possível subdivisão dos subgrupos de doenças consoante a actividade da mesma poderá conduzir a um conhecimento mais aprofundado destas moléculas e do seu envolvimento nesta doenças, o que se revela verdadeiramente promissor e uma esperança para os doentes que padecem destas patologias.

O nosso estudo revela variadíssimas direcções que devem ser exploradas nestas patologias pelos interessantes resultados já obtidos nesta fase ainda precoce do estudo.

Discussão/Conclusão

As DPI representam um grupo diverso de doenças pulmonares, incluindo mais de 200 diferentes membros classificadas em várias categorias.

Actualmente, a aplicação mais frutífera dos biomarcadores seria a de acompanhar a actividade da doença e, por conseguinte a detecção precoce de pacientes com maior probabilidade de sofrerem progressão da doença e de não responderem ao tratamento.

Portanto, um grande desafio seria encontrar um biomarcador sérico confiável que reflectisse o comportamento da doença antes de esta se tornar clinicamente evidente. Um biomarcador que fosse facilmente reprodutível e não-invasivo (possibilidade de medições seriadas). Os níveis iniciais deste biomarcador poderiam levar a uma detecção precoce de recaída e, assim, permitir avaliar a terapêutica a que o paciente está a ser sujeito, dando espaço para a sua alteração antes que o tratamento tenha efectivamente falhado.

Um importante número de biomarcadores séricos ou proteínas pulmonares, biomarcadores tumorais e citocinas têm sido alvo de estudo e têm sugerido alguns aspectos da imunopatogénese das DPI. Infelizmente os biomarcadores não dão indicações para a terapia nem marcam o fim do processo inflamatório e o seu valor prognóstico ainda precisa de ser estabelecido.

Vários pacientes com sarcoidose vêm a desenvolver a lesão e fibrose pulmonar irreversível culminando num desfecho fatal. Apesar da controversa utilidade da ECA em reflectir a actividade da doença, esta continua a ser o biomarcador mais confiável e bem definido. No entanto só deve ser usada como adjuvante, contra ou a favor da sarcoidose, e não isoladamente como patognomónico do diagnóstico(26).

A diminuição das células NKT na sarcoidose poderá promover uma actividade Th1 exagerada. O papel das células T reguladoras é controverso(24).

O sIL-2R e a quitotriosidase representam duas das aplicações mais promissoras sendo necessária mais informação sobre a variação destes biomarcadores no tempo e com a terapia(42). Deve esclarecer-se quais e quantos biomarcadores inflamatórios são necessários para caracterizar o padrão clínico do paciente. É importante determinar quais são os biomarcadores de progressão para doença crónica e fibrose pulmonar, para recaída e de resposta à terapêutica. É necessário avaliar a sua relação custo-benefício em relação às informações clínicas que prestam. Estes aspectos relevantes precisam de ser discutidos por um grupo de profissionais dedicados à área e deve ser elaborado um projecto comum para coordenar futuras pesquisas neste campo. Os biomarcadores poderiam ainda ser úteis para estabelecer o tipo de apresentação (“fenótipo”) da sarcoidose.

Embora se tenha assistido a uma melhoria das estratégias de diagnóstico e seguimento da sarcoidose, a determinação das suas causas e das populações de risco melhorariam não só o diagnóstico e tratamento como poderiam ser úteis para delinear estratégias de prevenção.

Apesar de nenhum biomarcador ter chegado perto do ideal, as proteínas específicas do epitélio pulmonar principalmente KL-6 e SP-D mostram-se promissoras na FPI e outras DPI.

A FPI ocorre em cerca de 2 a 29 casos por 100.000 habitantes por ano(97) com uma sobrevivência média de 2 a 3 anos após o diagnóstico independentemente do tratamento(98).

O prognóstico sombrio da FPI torna-a uma das doenças não malignas mais letais no mundo ocidental(190). Nesta patologia há ainda muitas questões por explorar que poderiam acrescentar muito ao conhecimento actual e permitir avanços consideráveis. Serão os fibrócitos presentes na doença estável diferentes dos das exacerbações? Qual é a causa do seu influxo sanguíneo? De que forma aumentam a fibrose? Existem estudos a decorrer nesta área.

Chesney(191) sugere que os fibrócitos possam ter efeitos parácrinos activando os fibroblastos residentes no pulmão pela secreção de mediadores pró-fibróticos como o TGF- β . Van Deventer(192) acrescenta ainda que os fibrócitos induzirão a transição de células epiteliais para células mesenquimatosas pela secreção ou indução de proteases (ex. MMP9) e factores pró-fibróticos. Estes cenários devem também ser testados em modelos animais.

Um futuro objectivo será estabelecer se o número de fibrócitos poderá ser um indicador de mortalidade na FPI com utilidade clínica. Análises seriadas de fibrócitos podem prever a estabilidade, degradação e/ou exacerbação aguda. Um estudo de Moeller(112), incluindo 15 pacientes estáveis com FPI não mostrou diferença na percentagem de fibrócitos circulantes quando medida em dois tempos diferentes entre 4 a 12 meses após a análise inicial.

Em contrapartida, elevadas percentagens de fibrócitos são preditivas de mortalidade.

Assim, é possível que um aumento relativo no número fibrócitos possa preceder a rápida deterioração clínica e funcional na FPI.

Outra questão pertinente é se as variações na percentagem de fibrócitos estão relacionadas com a resposta á terapêutica. E será que uma terapêutica eficaz diminuirá a percentagem de fibrócitos circulantes(112)?

A comissão da ATS das guidelines 2011 para a FPI incentiva a realização de estudos de larga escala e estudos de coorte bem descritos para a investigação de biomarcadores(97).

Nas pneumopatias ocupacionais e ambientais, o único estudo de seguimento mostrou o TNF- α como o mais valioso indicador da actividade e progressão da doença para fibrose(7).

Clinical Utilities	Key Biomarkers						
	KL-6	SP-A	SP-D	CC16	sIL-2R	ACE	TNF α
Detection of lung disease	++	++	++	+	NE	++	++
Histospecific diagnostic accuracy	+ / -	+	+ / -	NE	NE	+	NE
Correlation with disease severity	++	+	++	+	++	+	++
Prediction of response to therapy	+	+ / -	+ / -	NE	NE	+ / -	NE
Prediction of decline	+	+ / -	+	+ / -	+	+ / -	+ / -

Abbreviations: ACE: Angiotensin Converting Enzyme, CC16: Clara-cell protein 16, KL-6: Krebs von den Lungen-6, LDH: Lactate Dehydrogenase, ILDs: Interstitial Lung Diseases, sIL-2R: soluble interleukin-2 receptor, SP: Surfactant Protein, TNF: Tumor Necrosis Factor NE: Not Evaluated, 0: No utility, + / -: Low, +: Moderate, ++: High Utility

Ilustração 12 - Biomarcadores com potencial utilidade clínica nas DPI(7).

Os vários estudos criam expectativas nos clínicos, mas no entanto têm muitas limitações, incluindo metodologias não padronizadas, falta de normalização, de reprodutibilidade e de associação com o comportamento da doença; a maioria destes estudos contou também com uma amostra insuficiente de doentes para que fosse possível obter significância estatística.

Outro dos problemas com que nos deparamos é que os biomarcadores que têm sido testados são também influenciados por outras patologias como neoplasias, estádios inflamatórios ou outras doenças pulmonares(7).

Apesar da maioria dos biomarcadores se mostrar clinicamente útil para detectar as DPI e de estarem relativamente bem correlacionados com a gravidade da doença, eles falham como biomarcadores de prognóstico ou de avaliação de resposta à terapêutica(7, 133).

É ainda necessário ter em conta que a elevação dos biomarcadores séricos não se relaciona apenas com o aumento da sua produção a nível pulmonar reflectindo a gravidade da doença, mas também com uma possível diminuição de eliminação renal pelo comprometimento renal concomitante muitas vezes presente nestas patologias(7, 82, 86).

Importa ainda referir que apenas uma minoria dos estudos utilizou curvas ROC, essenciais para estimar a sensibilidade e especificidade de um biomarcador e para estabelecer pontos de corte(7).

As DPI continuam ainda pouco compreendidas e muito provavelmente a ambiguidade na compreensão do papel destes biomarcadores na sua patogénese limita o seu uso clínico.

Para os biomarcadores se tornarem um instrumento útil é necessário cumprirem um conjunto de requisitos. Estes referem-se a: equipamentos (centros, tecnologia), grupos de doentes com DPI bem caracterizados e seleccionados e projectos cuidadosamente planeados, com estudo de populações significativas, equipas com colaboradores interdisciplinares e apoios financeiros adequados. Tendo sempre em conta as limitações éticas jurídicas e sociais da experimentação humana(150).

Estes resultados sublinham a necessidade de mais estudos prospectivos para avaliação e validação de novas moléculas.

Novas investigações encontrarão novos biomarcadores que estejam associados com a patogénese destas doenças e mostrarão utilidade na prática clínica. Tal como já acontece hoje em dia com os marcadores tumorais.

No entanto a aplicação clínica exige validação em contextos múltiplos, a evidência experimental que explique a fisiopatologia e, idealmente, estudos que mostrem que a utilização desses biomarcadores melhoram os resultados clínicos.

A recente aplicação de instrumentos de análise de genoma, tais como os “microarrays” de ADN neste campo(7) levou a um aumento da taxa de descoberta de genes envolvidos no início e progressão das doenças. Com estas novas técnicas podemos investir na compreensão destas doenças de forma a facilitar a busca de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e até mesmo de encontrar alvos terapêuticos. Esta pode ser uma ponte para alcançar maior

conhecimento na área. Estes biomarcadores podem ser bastante úteis para complementar a avaliação clínica, radiológica e monitorização fisiológica da doença e identificar doentes de alto risco que beneficiariam de uma gestão agressiva dos factores de risco estabelecidos(7).

O estudo que temos em curso revelou já um enorme potencial. Vários dos biomarcadores da inflamação testados parecem trazer informações valiosas sobre as DPI. Acreditamos que a continuação do estudo, levando a uma melhor definição do papel e do padrão de expressão dos biomarcadores em cada uma das patologias possa ter um impacto na morbilidade e mortalidade dos pacientes.

Referências:

1. Kasper Dea. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed: Mc Graw Hill; 2008.
2. Wells AU, Hirani N. Interstitial lung disease guideline. Thorax. 2008 September 1, 2008;63(Suppl 5):v1-v58.
3. A Gomez TK. Classification of Diffuse Parenchymal Lung Disease. Chris T. Bolliger CT, editor 2007.
4. The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults. Introduction. Thorax. 1999 Apr;54 Suppl 1:S1-14.
5. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Jan 15;165(2):277-304.
6. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. Am J Respir Crit Care Med. 1998 Apr;157(4 Pt 1):1301-15.
7. Tzouvelekis A, Kouliatsis G, Anevlavis S, Bouros D. Serum biomarkers in interstitial lung diseases. Respiratory Research. 2005;6(1):78.
8. Latsi PI, du Bois RM, Nicholson AG, Colby TV, Bisirtzoglou D, Nikolakopoulou A, et al. Fibrotic Idiopathic Interstitial Pneumonia: The Prognostic Value of Longitudinal Functional Trends. Am J Respir Crit Care Med. 2003 September 1, 2003;168(5):531-7.
9. Flaherty KR, Mumford JA, Murray S, Kazerooni EA, Gross BH, Colby TV, et al. Prognostic implications of physiologic and radiographic changes in idiopathic interstitial pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Sep 1;168(5):543-8.
10. Ferrigno D, Buccheri G, Biggi A. Serum tumour markers in lung cancer: history, biology and clinical applications. Eur Respir J. 1994 Jan;7(1):186-97.

11. Manolio T. Novel risk markers and clinical practice. *N Engl J Med.* 2003 Oct 23;349(17):1587-9.
12. Knottnerus JA, van Weel C, Muris JW. Evaluation of diagnostic procedures. *BMJ.* 2002 Feb 23;324(7335):477-80.
13. Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest.* 1989 Jul;96(1):68-73.
14. HERMANS C, BERNARD A. Lung Epithelium-specific Proteins . Characteristics and Potential Applications as Markers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 February 1, 1999;159(2):646-78.
15. Baughman RP, Costabel U, Meyer KC. Bronchoalveolar Lavage. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007 02.11.2007;28(05):473,4.
16. Hunninghake GW, Crystal RG. Pulmonary Sarcoidosis. *New England Journal of Medicine.* 1981;305(8):429-34.
17. Klech H PW. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur Respir J.* 1989 Jun;2(6):561-85.
18. Haslam PL, Baughman RP. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. *Eur Respir J.* 1999 Aug;14(2):245-8.
19. Baughman RP. Technical Aspects of Bronchoalveolar Lavage: Recommendations for a Standard Procedure. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007 02.11.2007;28(05):475,85.
20. Chollet S, Soler P, Dournovo P, Richard MS, Ferrans VJ, Basset F. Diagnosis of pulmonary histiocytosis X by immunodetection of Langerhans cells in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Pathol.* 1984 May;115(2):225-32.

21. Zompi S, Couderc LJ, Cadranel J, Antoine M, Epardeau B, Fleury-Feith J, et al. Clonality analysis of alveolar B lymphocytes contributes to the diagnostic strategy in clinical suspicion of pulmonary lymphoma. *Blood*. 2004 Apr 15;103(8):3208-15.
22. Phadke SM, Chini BA, Patton D, Goyal RK. Relapsed non-Hodgkin's lymphoma diagnosed by flexible bronchoscopy. *Pediatr Pulmonol*. 2002 Dec;34(6):488-90.
23. Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Sarcoidosis. *N Engl J Med*. 2007 Nov 22;357(21):2153-65.
24. Morgenthau AS, Iannuzzi MC. Recent advances in sarcoidosis. *Chest*. 2011 Jan;139(1):174-82.
25. Maier LA, Kittle LA, Mroz MM, Newman LS. Beryllium-stimulated neopterin as a diagnostic adjunct in chronic beryllium disease. *American Journal of Industrial Medicine*. 2003;43(6):592-601.
26. Baughman RP, Culver DA, Judson MA. A Concise Review of Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Oct 29.
27. Poulter LW, Rossi GA, Bjermer L, Costabel U, Israel-Biet D, Klech H, et al. The value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and prognosis of sarcoidosis. *Eur Respir J*. 1990 Sep;3(8):943-4.
28. Welker L, Jorres RA, Costabel U, Magnussen H. Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung diseases. *Eur Respir J*. 2004 Dec;24(6):1000-6.
29. Kantrow S, Meyer K, Kidd P, Raghu G. The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *European Respiratory Journal*. 1997 December 1, 1997;10(12):2716-21.
30. Leatherman JW, Michael AF, Schwartz BA, Hoidal JR. Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis. *Ann Intern Med*. 1984 Mar;100(3):390-2.

31. Ando M, Konishi K, Yoneda R, Tamura M. Difference in the phenotypes of bronchoalveolar lavage lymphocytes in patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis, farmer's lung, ventilation pneumonitis, and bird fancier's lung: report of a nationwide epidemiologic study in Japan. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 May;87(5):1002-9.
32. Drent M, Mansour K, Linssen C. Bronchoalveolar Lavage in Sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007 02.11.2007;28(05):486,95.
33. Costabel U, Hunninghake GW. 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 Oct;14(4):735-7.
34. Costabel U. Sarcoidosis: clinical update. *Eur Respir J Suppl*. 2001 Sep;32:56s-68s.
35. Baughman RP, Drent M. Role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Clin Chest Med*. 2001 Jun;22(2):331-41.
36. Costabel U, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2001 Sep;7(5):255-61.
37. Wahlstrom J, Katchar K, Wigzell H, Olerup O, Eklund A, Grunewald J. Analysis of intracellular cytokines in CD4+ and CD8+ lung and blood T cells in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jan;163(1):115-21.
38. Baughman RP, Strohofer SA, Buchsbaum J, Lower EE. Release of tumor necrosis factor by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. *J Lab Clin Med*. 1990 Jan;115(1):36-42.
39. Semenzato G BE, Brunetta C, et al. Immunology and pathophysiology. *Eur Respir Mon*. 2005;32:49-64.

40. Baughman RP, Drent M, Kavuru M, Judson MA, Costabel U, du Bois R, et al. Infliximab therapy in patients with chronic sarcoidosis and pulmonary involvement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Oct 1;174(7):795-802.
41. Fehrenbach H, Zissel G, Goldmann T, Tschernig T, Vollmer E, Pabst R, et al. Alveolar macrophages are the main source for tumour necrosis factor-alpha in patients with sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2003 Mar;21(3):421-8.
42. Bargagli E, Bianchi N, Margollicci M, Olivieri C, Luddi A, Coviello G, et al. Chitotriosidase and soluble IL-2 receptor: Comparison of two markers of sarcoidosis severity. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 2008;68(6):479-83.
43. Moller DR. Treatment of sarcoidosis -- from a basic science point of view. *J Intern Med*. 2003 Jan;253(1):31-40.
44. Planck A, Eklund A, Grunewald J. Inflammatory BAL-fluid and serum parameters in HLA DR17 positive vs. DR17 negative patients with pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2001 Mar;18(1):64-9.
45. Reynolds HY. Use of Bronchoalveolar Lavage in Humans—Past Necessity and Future Imperative. *Lung*. 2000;178(5):271-93.
46. Thomas PD, Hunninghake GW. Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis*. 1987 Mar;135(3):747-60.
47. Rottoli P, Magi B, Perari MG, Liberatori S, Nikiforakis N, Bargagli E, et al. Cytokine profile and proteome analysis in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics*. 2005 Apr;5(5):1423-30.
48. Winterbauer RH, Lammert J, Selland M, Wu R, Corley D, Springmeyer SC. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest*. 1993 Aug;104(2):352-61.

49. Pesci A, Bertorelli G, Gabrielli M, Olivieri D. Mast cells in fibrotic lung disorders. *Chest*. 1993 Apr;103(4):989-96.
50. Drent M, Jacobs J, de Vries J, Lamers R, Liem I, Wouters E. Does the cellular bronchoalveolar lavage fluid profile reflect the severity of sarcoidosis? *European Respiratory Journal*. 1999 June 1, 1999;13(6):1338-44.
51. Drent M, Jacobs JA, Cobben NA, Costabel U, Wouters EF, Mulder PG. Computer program supporting the diagnostic accuracy of cellular BALF analysis: a new release. *Respir Med*. 2001 Oct;95(10):781-6.
52. Schnabel A, Reuter M, Gloeckner K, Muller-Quernheim J, Gross WL. Bronchoalveolar lavage cell profiles in Wegener's granulomatosis. *Respir Med*. 1999 Jul;93(7):498-506.
53. Carr PL, Singer DE, Goldenheim P, Bernardo J, Mulley AG. Noninvasive testing of asymptomatic bilateral hilar adenopathy. *J Gen Intern Med*. 1990 Mar-Apr;5(2):138-46.
54. Poletti V, Romagna M, Gasponi A, Baruzzi G, Allen KA. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of low-grade, MALT type, B-cell lymphoma in the lung. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1995 May;50(3):191-4.
55. Wisecarver J, Ness MJ, Rennard SI, Thompson AB, Armitage JO, Linder J. Bronchoalveolar lavage in the assessment of pulmonary Hodgkin's disease. *Acta Cytol*. 1989 Jul-Aug;33(4):527-32.
56. Drent M, Wagenaar SS, Mulder PH, van Velzen-Blad H, Diamant M, van den Bosch JM. Bronchoalveolar lavage fluid profiles in sarcoidosis, tuberculosis, and non-Hodgkin's and Hodgkin's disease. An evaluation of differences. *Chest*. 1994 Feb;105(2):514-9.
57. Bagatin E, Pereira CA, Afiune JB. [Granulomatous diseases of occupational etiology]. *J Bras Pneumol*. 2006;32 Suppl 2:S69-84.

58. Drent M, van Velzen-Blad H, Diamant M, Hoogsteden HC, van den Bosch JM. Relationship between presentation of sarcoidosis and T lymphocyte profile. A study in bronchoalveolar lavage fluid. *Chest*. 1993 September 1, 1993;104(3):795-800.
59. Grunewald J, Eklund A. Sex-specific manifestations of Lofgren's syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jan 1;175(1):40-4.
60. 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 Mar 15;169(6):696-702.
61. Ziegenhagen MW, Rothe ME, Zissel G, Muller-Quernheim J. Exaggerated TNFalpha release of alveolar macrophages in corticosteroid resistant sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2002 Oct;19(3):185-90.
62. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA*. 2006 May 17;295(19):2275-85.
63. Baughman RP, Lynch JP. Difficult treatment issues in sarcoidosis. *J Intern Med*. 2003 Jan;253(1):41-5.
64. Baughman RP, Lower EE. Fungal infections as a complication of therapy for sarcoidosis. *QJM*. 2005 June 2005;98(6):451-6.
65. Schilstra A, Rottoli P, Jacobs JA, van Suylen RJ, Galluzzi P, Drent M. Case studies to explore the pitfalls in the diagnosis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2006 Jun;23(2):135-40.
66. Muller-Quernheim J. Serum markers for the staging of disease activity of sarcoidosis and other interstitial lung diseases of unknown etiology. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 1998 Mar;15(1):22-37.

67. Lawrence EC, Brousseau KP, Berger MB, Kurman CC, Marcon L, Nelson DL. Elevated concentrations of soluble interleukin-2 receptors in serum samples and bronchoalveolar lavage fluids in active sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Apr;137(4):759-64.
68. Keicho N, Kitamura K, Takaku F, Yotsumoto H. Serum concentration of soluble interleukin-2 receptor as a sensitive parameter of disease activity in sarcoidosis. *Chest.* 1990 November 1, 1990;98(5):1125-9.
69. Rossman MD, Thompson B, Frederick M, Maliarik M, Iannuzzi MC, Rybicki BA, et al. HLA-DRB1*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *Am J Hum Genet.* 2003 Oct;73(4):720-35.
70. Grunewald J, Brynedal B, Darlington P, Nisell M, Cederlund K, Hillert J, et al. Different HLA-DRB1 allele distributions in distinct clinical subgroups of sarcoidosis patients. *Respir Res.* 2010;11:25.
71. Ziegenhagen MW, Benner UK, Zissel G, Zabel P, Schlaak M, Muller-Quernheim J. Sarcoidosis: TNF-alpha release from alveolar macrophages and serum level of sIL-2R are prognostic markers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Nov;156(5):1586-92.
72. Ziegenhagen MW, Rothe ME, Schlaak M, Muller-Quernheim J. Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2003 Mar;21(3):407-13.
73. Lieberman J, Schleissner LA, Nosal A, Sastre A, Mishkin FS. Clinical correlations of serum angiotensin-converting enzyme (ACE) in sarcoidosis. A longitudinal study of serum ACE, ⁶⁷gallium scans, chest roentgenograms, and pulmonary function. *Chest.* 1983 Nov;84(5):522-8.

74. Ainslie GM, Poulter LW, du Bois RM. Relation between immunocytological features of bronchoalveolar lavage fluid and clinical indices in sarcoidosis. *Thorax*. 1989 June 1, 1989;44(6):501-9.
75. Prior C, Barbee R, Evans P, Townsend P, Primett Z, Fyhrquist F, et al. Lavage versus serum measurements of lysozyme, angiotensin converting enzyme and other inflammatory markers in pulmonary sarcoidosis. *European Respiratory Journal*. 1990 November 1, 1990;3(10):1146-54.
76. Sharma P, Smith I, Maguire G, Stewart S, Shneerson J, Brown MJ. Clinical value of ACE genotyping in diagnosis of sarcoidosis. *Lancet*. 1997 May 31;349(9065):1602-3.
77. Tomita H, Ina Y, Sugiura Y, Sato S, Kawaguchi H, Morishita M, et al. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jul;156(1):255-9.
78. Papadopoulos KI, Melander O, Orho-Melander M, Groop LC, Carlsson M, Hallengren B. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism in sarcoidosis in relation to associated autoimmune diseases. *J Intern Med*. 2000 Jan;247(1):71-7.
79. McGrath DS, Foley PJ, Petrek M, Izakovicova-Holla L, Kolek V, Veeraraghavan S, et al. Ace gene I/D polymorphism and sarcoidosis pulmonary disease severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jul 15;164(2):197-201.
80. Hashimoto S, Nakayama T, Gon Y, Hata N, Koura T, Maruoka S, et al. Correlation of plasma monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and monocyte inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) levels with disease activity and clinical course of sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 1998 Mar;111(3):604-10.
81. Iyonaga K, Suga M, Ichiyasu H, Yamamoto T, Hiraga Y, Ando M. Measurement of serum monocyte chemoattractant protein-1 and its clinical application for estimating the

activity of granuloma formation in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1998 Sep;15(2):165-72.

82. Hermans C, Petrek M, Kolek V, Weynand B, Pieters T, Lambert M, et al. Serum Clara cell protein (CC16), a marker of the integrity of the air-blood barrier in sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2001 Sep;18(3):507-14.

83. Janssen R, Sato H, Grutters JC, Bernard A, van Velzen-Blad H, du Bois RM, et al. Study of Clara Cell 16, KL-6, and Surfactant Protein-D in Serum as Disease Markers in Pulmonary Sarcoidosis*. *Chest.* 2003 December 1, 2003;124(6):2119-25.

84. Lesur O, Bernard A, Arsalane K, Lauwerys R, Begin R, Cantin A, et al. Clara cell protein (CC-16) induces a phospholipase A2-mediated inhibition of fibroblast migration in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Jul;152(1):290-7.

85. Kohno N, Akiyama M, Kyoizumi S, Hakoda M, Kobuke K, Yamakido M. Detection of Soluble Tumor-associated Antigens in Sera and Effusions Using Novel Monoclonal Antibodies, KL-3 and KL-6, against Lung Adenocarcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology.* 1988 September 1, 1988;18(3):203-16.

86. Doyle IR, Hermans C, Bernard A, Nicholas TE, Bersten AD. Clearance of Clara cell secretory protein 16 (CC16) and surfactant proteins A and B from blood in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Nov;158(5 Pt 1):1528-35.

87. Miyoshi S, Hamada H, Kadowaki T, Hamaguchi N, Ito R, Irifune K, et al. Comparative evaluation of serum markers in pulmonary sarcoidosis. *Chest.* 2010 Jun;137(6):1391-7.

88. Kobayashi J, Kitamura S. Serum KL-6 for the evaluation of active pneumonitis in pulmonary sarcoidosis. *Chest.* 1996 May;109(5):1276-82.

89. Rothkrantz-Kos S, van Dieijen-Visser MP, Mulder PG, Drent M. Potential usefulness of inflammatory markers to monitor respiratory functional impairment in sarcoidosis. *Clin Chem*. 2003 Sep;49(9):1510-7.
90. Muller-Quernheim J. Sarcoidosis: immunopathogenetic concepts and their clinical application. *European Respiratory Journal*. 1998 September 1, 1998;12(3):716-38.
91. Bargagli E, Mazzi A, Rottoli P. Markers of Inflammation in Sarcoidosis: Blood, Urine, BAL, Sputum, and Exhaled Gas. *Clinics in Chest Medicine*. [doi: DOI: 10.1016/j.ccm.2008.03.004]. 2008;29(3):445-58.
92. Brunner J, Scholl-Bürgi S, Prelog M, Zimmerhackl L-B. Chitotriosidase as a marker of disease activity in sarcoidosis. *Rheumatology International*. 2007;27(12):1185-6.
93. Bargagli E, Margollicci M, Nikiforakis N, Luddi A, Perrone A, Grosso S, et al. Chitotriosidase activity in the serum of patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. *Respiration*. 2007;74(5):548-52.
94. Paramothayan NS, Lasserson TJ, Jones PW. Corticosteroids for pulmonary sarcoidosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005(2):CD001114.
95. Paramothayan S, Lasserson TJ, Walters EH. Immunosuppressive and cytotoxic therapy for pulmonary sarcoidosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;3:CD003536.
96. Stagaki E, Mountford WK, Lackland DT, Judson MA. The treatment of lupus pernio: results of 116 treatment courses in 54 patients. *Chest*. 2009 Feb;135(2):468-76.
97. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 March 15, 2011;183(6):788-824.

98. Huie TJ, Moss M, Frankel SK. What can biomarkers tell us about the pathogenesis of acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis? *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2010 July 1, 2010;299(1):L1-L2.
99. Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, Starko KM, Bradford WZ, King TE, et al. The Clinical Course of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annals of Internal Medicine*. 2005 June 21, 2005;142(1):963-7.
100. Song JW, Do K-H, Kim M-Y, Jang SJ, Colby TV, Kim DS. Pathologic and Radiologic Differences Between Idiopathic and Collagen Vascular Disease-Related Usual Interstitial Pneumonia. *Chest*. 2009 July 1, 2009;136(1):23-30.
101. Wallace WA, Ramage EA, Lamb D, Howie SE. A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). *Clin Exp Immunol*. 1995 Sep;101(3):436-41.
102. Majumdar S, Li D, Ansari T, Pantelidis P, Black CM, Gizycki M, et al. Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies. *Eur Respir J*. 1999 Aug;14(2):251-7.
103. Jakubzick C, Choi ES, Kunkel SL, Evanoff H, Martinez FJ, Puri RK, et al. Augmented pulmonary IL-4 and IL-13 receptor subunit expression in idiopathic interstitial pneumonia. *J Clin Pathol*. 2004 May;57(5):477-86.
104. Park SW, Ahn MH, Jang HK, Jang AS, Kim DJ, Koh ES, et al. Interleukin-13 and its receptors in idiopathic interstitial pneumonia: clinical implications for lung function. *J Korean Med Sci*. 2009 Aug;24(4):614-20.
105. Nagao T, Nagai S, Kitaichi M, Hayashi M, Shigematsu M, Tsutsumi T, et al. Usual interstitial pneumonia: idiopathic pulmonary fibrosis versus collagen vascular diseases. *Respiration*. 2001;68(2):151-9.

106. Nagai S, Fujimura N, Hirata T, Izumi T. Differentiation between idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases by comparison of the ratio of OKT4+ cells and OKT8+ cells in BALF T lymphocytes. *Eur J Respir Dis.* 1985 Jul;67(1):1-9.
107. Nagai S, Izumi T. Immunopathology of collagen vascular disease. *Curr Opin Pulm Med.* 1997 Sep;3(5):356-60.
108. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, et al. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Jan 15;173(2):188-98.
109. Emura M, Nagai S, Takeuchi M, Kitaichi M, Izumi T. In vitro production of B cell growth factor and B cell differentiation factor by peripheral blood mononuclear cells and bronchoalveolar lavage T lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 1990 Oct;82(1):133-9.
110. Kazufumi M, Sonoko N, Masanori K, Takateru I, Akira O. Expression of bcl-2 protein and APO-1 (Fas antigen) in the lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Microsc Res Tech.* 1997 Sep 1;38(5):480-7.
111. Ohshimo S, Bonella F, Cui A, Beume M, Kohno N, Guzman J, et al. Significance of bronchoalveolar lavage for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Jun 1;179(11):1043-7.
112. Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gauldie J, et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Apr 1;179(7):588-94.
113. Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, et al. Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 October 15, 2008;178(8):838-46.

114. Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 2;105(35):13051-6.
115. Kubo H, Nakayama K, Yanai M, Suzuki T, Yamaya M, Watanabe M, et al. Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005 Sep;128(3):1475-82.
116. Collard HR, Calfee CS, Wolters PJ, Song JW, Hong SB, Brady S, et al. Plasma biomarker profiles in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Jul;299(1):L3-7.
117. Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E, Nagae H, Takahashi H, Akino T, et al. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Dec;152(6 Pt 1):1860-6.
118. Kobayashi J, Kitamura S. KL-6: A Serum Marker for Interstitial Pneumonia. *Chest*. 1995 August 1, 1995;108(2):311-5.
119. Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, et al. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med*. 1988 Feb 1;167(2):570-81.
120. Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni-Grassi G, Walz A. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Mar;149(3 Pt 1):655-9.
121. Kohno N, Yokoyama A, Hirasawa Y, Kondo K, Fujino S, Abe M, et al. Comparative studies of circulating KL-6, type III procollagen N-terminal peptide and type IV collagen 7S in patients with interstitial pneumonitis and alveolar pneumonia. *Respir Med*. 1997 Oct;91(9):558-61.

122. Inoue Y, Nishimura K, Shiode M, Akutsu H, Hamada H, Fujioka S, et al. Evaluation of serum KL-6 levels in patients with pulmonary tuberculosis. *Tuber Lung Dis.* 1995 Jun;76(3):230-3.
123. TAKAHASHI H, FUJISHIMA T, KOBA H, MURAKAMI S, KUROKAWA K, SHIBUYA Y, et al. Serum Surfactant Proteins A and D as Prognostic Factors in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Their Relationship to Disease Extent. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 September 1, 2000;162(3):1109-14.
124. Takahashi H, Shiratori M, Kanai A, Chiba H, Kuroki Y, Abe S. Monitoring markers of disease activity for interstitial lung diseases with serum surfactant proteins A and D. *Respirology.* 2006;11:S51-S4.
125. McCormack FX, King TE, Jr., Voelker DR, Robinson PC, Mason RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Jul;144(1):160-6.
126. Honda Y, Tsunematsu K, Suzuki A, Akino T. Changes in phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. *Lung.* 1988;166(5):293-301.
127. Jegal Y, Kim DS, Shim TS, Lim C-M, Do Lee S, Koh Y, et al. Physiology Is a Stronger Predictor of Survival than Pathology in Fibrotic Interstitial Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 March 15, 2005;171(6):639-44.
128. Takahashi H, Sano H, Chiba H, Kuroki Y. Pulmonary surfactant proteins A and D: Innate immune functions and biomarkers for lung diseases. *Current Pharmaceutical Design.* 2006;12(5):589-98.
129. Yokoyama A, Kohno N, Hamada H, Sakatani M, Ueda E, Kondo K, et al. Circulating KL-6 predicts the outcome of rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Nov;158(5 Pt 1):1680-4.

130. Greene KE, King TE, Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman LS, et al. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2002 March 1, 2002;19(3):439-46.
131. Yanaba K, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum KL-6 levels in patients with systemic sclerosis: association with the activity of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2003 Jul-Aug;21(4):429-36.
132. Yanaba K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Comparative study of serum surfactant protein-D and KL-6 concentrations in patients with systemic sclerosis as markers for monitoring the activity of pulmonary fibrosis. *The Journal of Rheumatology*. 2004 June 1, 2004;31(6):1112-20.
133. Ishii H, Mukae H, Kadota J, Kaida H, Nagata T, Abe K, et al. High serum concentrations of surfactant protein A in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia. *Thorax*. 2003 Jan;58(1):52-7.
134. Kinder BW, Brown KK, McCormack FX, Ix JH, Kervitsky A, Schwarz MI, et al. Serum Surfactant Protein-A Is a Strong Predictor of Early Mortality in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest*. 2009 June 1, 2009;135(6):1557-63.
135. Dobashi N, Fujita J, Ohtsuki Y, Yamadori I, Yoshinouchi T, Kamei T, et al. Elevated serum and BAL cytokeratin 19 fragment in pulmonary fibrosis and acute interstitial pneumonia. *Eur Respir J*. 1999 Sep;14(3):574-8.
136. Satoh H, Kamama H, Ogata T, Yano H, Ohtsuka M, Hasegawa S. Clinical significance of serum levels of a carbohydrate antigen, sialyl SSEA-1, in patients with fibrosing lung disease. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Nov;144(5):1177-81.
137. Takayama S, Kataoka N, Usui Y, Inase N, Natori Y, Nakayama M, et al. [CA 19-9 in patients with benign pulmonary diseases]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 1990 Oct;28(10):1326-31.

138. Satoh H, Ishikawa H, Yamashita YT, Ohtsuka M, Sekizawa K. Serum sialyl Lewis X-i antigen in lung adenocarcinoma and idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2002 Mar;57(3):263-6.
139. Obayashi Y, Fujita J, Nishiyama T, Yoshinouchi T, Kamei T, Yamadori I, et al. Role of carbohydrate antigens sialyl Lewis (a) (CA19-9) in bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary fibrosis. *Respiration*. 2000;67(2):146-52.
140. Suga M, Iyonaga K, Ichiyasu H, Saita N, Yamasaki H, Ando M. Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J*. 1999 Aug;14(2):376-82.
141. Strieter RM, Starko KM, Enelow RI, Noth I, Valentine VG, the other members of the Idiopathic Pulmonary Fibrosis Biomarkers Study Group. Effects of Interferon- γ 1b on Biomarker Expression in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 July 15, 2004;170(2):133-40.
142. Kuwano K, Maeyama T, Inoshima I, Ninomiya K, Hagimoto N, Yoshimi M, et al. Increased circulating levels of soluble Fas ligand are correlated with disease activity in patients with fibrosing lung diseases. *Respirology*. 2002 Mar;7(1):15-21.
143. Kadota J, Mizunoe S, Mito K, Mukae H, Yoshioka S, Kawakami K, et al. High plasma concentrations of osteopontin in patients with interstitial pneumonia. *Respir Med*. 2005 Jan;99(1):111-7.
144. Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, et al. MMP1 and MMP7 as Potential Peripheral Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS Med*. 2008;5(4):e93.
145. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jun;3(4):383-8.

146. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, et al. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Sep;279(3):L562-74.
147. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, et al. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Nov;162(5):1949-56.
148. Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest*. 1998 Jun;78(6):687-98.
149. Pardo A, Selman M, Kaminski N. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(6-7):1141-55.
150. Schulte PA. Use of Biomarkers to Investigate Occupational and Environmental Lung Disorders. *Chest*. 1996 March 1, 1996;109(3 Supplement):9S-12S.
151. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell*. 2002 Nov 27;111(5):635-46.
152. McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol*. 2003 Jun;162(6):1831-43.
153. Cosgrove GP, Schwarz MI, Geraci MW, Brown KK, Worthen GS. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 in pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002 Mar;121(3 Suppl):25S-6S.
154. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 April 30, 2002;99(9):6292-7.

155. Yang IV, Burch LH, Steele MP, Savov JD, Hollingsworth JW, McElvania-Tekippe E, et al. Gene expression profiling of familial and sporadic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Jan 1;175(1):45-54.
156. Rosas IO, Kaminski N. When It Comes to Genes--IPF or NSIP, Familial or Sporadic--They're All the Same. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 January 1, 2007;175(1):5-6.
157. Vuorinen K, MyllÄRniemi M, Lammi L, PiirilÄ P, RyttilÄ P, Salmenkivi K, et al. Elevated matrilysin levels in bronchoalveolar lavage fluid do not distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from other interstitial lung diseases. *APMIS.* 2007;115(8):969-75.
158. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand J Immunol.* 2009 Mar;69(3):268-74.
159. Shinoda H, Tasaka S, Fujishima S, Yamasawa W, Miyamoto K, Nakano Y, et al. Elevated CC Chemokine Level in Bronchoalveolar Lavage Fluid Is Predictive of a Poor Outcome of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respiration.* 2009;78(3):285-92.
160. Borm PJ. Biological markers and occupational lung disease: mineral dust-induced respiratory disorders. *Exp Lung Res.* 1994 Jul-Sep;20(5):457-70.
161. Cordeiro CR, Jones JC, Alfaro T, Ferreira AJ. Bronchoalveolar lavage in occupational lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007 Oct;28(5):504-13.
162. Mohr LC. Hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med.* 2004 Sep;10(5):401-11.
163. Patel AM, Ryu JH, Reed CE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Nov;108(5):661-70.
164. Fink JN, Schlueter DP, Sosman AJ, Unger GF, Barboriak JJ, Rimm AA, et al. Clinical survey of pigeon breeders. *Chest.* 1972 Sep;62(3):277-81.

165. Wolff H, Teppo AM, Mutanen P, Sutinen S, Backman R, Pietinalho A, et al. Studies of cytokine levels in bronchoalveolar fluid lavage from patients with interstitial lung diseases. *Scand J Clin Lab Invest.* 2003;63(1):27-36.
166. Takahashi T, Munakata M, Ohtsuka Y, Satoh-Kamachi A, Sato R, Homma Y, et al. Serum KL-6 concentrations in dairy farmers. *Chest.* 2000 Aug;118(2):445-50.
167. Ross DJ, Keynes HL, McDonald JC. SWORD '97: surveillance of work-related and occupational respiratory disease in the UK. *Occup Med (Lond).* 1998 Nov;48(8):481-5.
168. Barbarin V, Xing Z, Delos M, Lison D, Huaux F. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 May;288(5):L841-8.
169. Newman LS, Mroz MM, Balkissoon R, Maier LA. Beryllium sensitization progresses to chronic beryllium disease: a longitudinal study of disease risk. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Jan 1;171(1):54-60.
170. Costabel U. Atlas of bronchoalveolar lavage. London: Chapman & Hall Medical; 1998.
171. Sawyer RT, Parsons CE, Fontenot AP, Maier LA, Gillespie MM, Gottschall EB, et al. Beryllium-Induced Tumor Necrosis Factor- α Production by CD4⁺ T Cells Is Mediated by HLA-DP. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 July 1, 2004;31(1):122-30.
172. Rossman MD, Kern JA, Elias JA, Cullen MR, Epstein PE, Preuss OP, et al. Proliferative response of bronchoalveolar lymphocytes to beryllium. A test for chronic beryllium disease. *Ann Intern Med.* 1988 May;108(5):687-93.
173. Borm PJ, Meijers JM, Swaen GM. Molecular epidemiology of coal worker's pneumoconiosis: application to risk assessment of oxidant and monokine generation by mineral dusts. *Exp Lung Res.* 1990 Jan;16(1):57-71.

174. Borm PJ, Palmen N, Engelen JJ, Buurman WA. Spontaneous and stimulated release of tumor necrosis factor-alpha (TNF) from blood monocytes of miners with coal workers' pneumoconiosis. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Dec;138(6):1589-94.
175. Lassalle P, Gosset P, Aerts C, Fournier E, Lafitte JJ, Degreef JM, et al. Abnormal Secretion of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor α by Alveolar Macrophages in Coal Worker's Pneumoconiosis: Comparison between Simple Pneumoconiosis and Progressive Massive Fibrosis. *Experimental Lung Research.* 1990;16(1):73-80.
176. Schins RP, Borm PJ. Epidemiological evaluation of release of monocyte TNF-alpha as an exposure and effect marker in pneumoconiosis: a five year follow up study of coal workers. *Occupational and Environmental Medicine.* 1995 July 1, 1995;52(7):441-50.
177. Schins RP, Borm PJ. Serum procollagen type III peptide in coal workers' pneumoconiosis: a five-year follow-up study. *Exp Lung Res.* 1994 Jul-Sep;20(5):445-55.
178. Cobben NA, Drent M, Schols AM, Lamers RJ, Wouters EF, Van Dieijen-Visser MP. Serum lactate dehydrogenase and its isoenzyme pattern in ex-coalminers. *Respir Med.* 1997 Nov;91(10):616-23.
179. Cobben NA, Drent M, De Vries J, Wouters EF, Van Dieijen-Visser MP, Henderson RF. Serum beta-glucuronidase activity in a population of ex-coalminers. *Clin Biochem.* 1999 Nov;32(8):659-64.
180. Harris J, Bartelson BB, Barker E, Balkissoon R, Kreiss K, Newman LS. Serum neopterin in chronic beryllium disease. *Am J Ind Med.* 1997 Jul;32(1):21-6.
181. Ohnishi H, Yokoyama A, Yasuhara Y, Watanabe A, Naka T, Hamada H, et al. Circulating KL-6 levels in patients with drug induced pneumonitis. *Thorax.* 2003 Oct;58(10):872-5.

182. Kohno N, Hamada H, Fujioka S, Hiwada K, Yamakido M, Akiyama M. Circulating antigen KL-6 and lactate dehydrogenase for monitoring irradiated patients with lung cancer. *Chest*. 1992 Jul;102(1):117-22.
183. Goto K, Kodama T, Sekine I, Kakinuma R, Kubota K, Hojo F, et al. Serum levels of KL-6 are useful biomarkers for severe radiation pneumonitis. *Lung Cancer*. 2001 Oct;34(1):141-8.
184. Takahashi H, Imai Y, Fujishima T, Shiratori M, Murakami S, Chiba H, et al. Diagnostic significance of surfactant proteins A and D in sera from patients with radiation pneumonitis. *Eur Respir J*. 2001 Mar;17(3):481-7.
185. Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H, Akino T. Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):334-45.
186. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
187. Rothkrantz-Kos S, Drent M, Vuil H, De Boer M, Bast A, Wouters EF, et al. Decreased redox state in red blood cells from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2002 Jun;19(2):114-20.
188. Jinta T, Miyazaki Y, Kishi M, Akashi T, Takemura T, Inase N, et al. The pathogenesis of chronic hypersensitivity pneumonitis in common with idiopathic pulmonary fibrosis: expression of apoptotic markers. *Am J Clin Pathol*. 2010 Oct;134(4):613-20.
189. Hosokawa H, Kimura MY, Shinnakasu R, Suzuki A, Miki T, Koseki H, et al. Regulation of Th2 Cell Development by Polycomb Group Gene bmi-1 through the Stabilization of GATA3. *The Journal of Immunology*. 2006 December 1, 2006;177(11):7656-64.
190. Costabel U, King TE. International consensus statement on idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2001 Feb;17(2):163-7.

191. Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol.* 1998 Jan 1;160(1):419-25.
192. van Deventer HW, Wu QP, Bergstralh DT, Davis BK, O'Connor BP, Ting JP, et al. C-C chemokine receptor 5 on pulmonary fibrocytes facilitates migration and promotes metastasis via matrix metalloproteinase 9. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1):253-64.

