

Marília Dourado¹
Joana Bento²
Luís Mesquita³
Alcide Marques⁴
Sofia Vale-Pereira⁵
Ana Bela Sarmiento Ribeiro⁶
Anabela Mota Pinto⁷

Doseamento das granzimas A e B na sarcoidose pulmonar (estudo experimental)

Granzymes A and B in pulmonary sarcoidosis (experimental study)

Recebido para publicação/received for publication: 05.01.17
Aceite para publicação/accepted for publication: 05.03.24

Resumo

A sarcoidose é uma doença granulomatosa crónica de etiologia desconhecida. Atinge todos os órgãos e sistemas, particularmente o pulmão. O doseamento sérico da enzima de conversão da angiotensina (SACE) e da lisozima são exames complementares que contribuem para o seu diagnóstico e monitorização laboratorial. É desejável que outros marcadores

Abstract

Sarcoidosis is a systemic disease of unknown aetiology, morphologically characterized by well-formed epithelioid granulomas, which show little or no central necrosis. These may be present in any organ or tissue. The lung is the most frequently and prominently involved target. The granuloma is often very sharply demarcated from

¹ Professora Auxiliar de Fisiopatologia/Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

² Aluna da Licenciatura em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

³ Técnico Superior de 1ª Classe

⁴ Assistente Hospitalar Graduada de Pneumologia

⁵ Técnica Superior de 2ª Classe

⁶ Professora Auxiliar de Biologia Molecular/Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

⁷ Professora Associada de Fisiopatologia/Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Serviços, directores e endereços:

Instituto de Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Directora: Prof. Doutora Anabela Mota Pinto

Rua Larga

3004-504 Coimbra

Centro de Pneumologia do Hospital da Universidade de Coimbra

Director: Prof. Doutor Manuel Fontes Baganha. Hospital da Universidade de Coimbra

Praceta Mota Pinto

3000 Coimbra

possam otimizar a informação obtida com estes parâmetros. As granzimas A e B, produzidas por diversas células, poderão modular o *turnover* dos granulomas sarcoidóticos, tornando-se úteis como marcadores da doença.

Objectivos: Dosear as granzimas A e B e avaliar o seu interesse como marcadores laboratoriais de sarcoidose. Paralelamente, dosear a SACE e a lisozima, marcadores reconhecidos da doença.

Material e métodos: Indivíduos de ambos os sexos: Controlo normal (CN), n=30; controlo-doente (CD), n=21 (patologia pulmonar não granulomatosa); grupo-doente (D), n=11 (doentes com sarcoidose pulmonar).

Recolheram-se amostras de sangue periférico para obter soro que se separou por tubos identificados e guardados a -30°C .

Doseou-se a SACE por espectrofotometria e a lisozima por turbidimetria; as granzimas A e B por ELISA.

Resultados: A actividade de SACE está significativamente aumentada em D, comparativamente com CN e CD. A actividade da lisozima está significativamente aumentada nos grupos D e CD comparativamente com CN. A granzima B está significativamente diminuída nos grupos CD e D relativamente ao CN; a granzima A demonstrou diminuição significativa em D comparativamente com CN.

Sugere-se que a diminuição das granzimas, na sarcoidose, poderá relacionar-se com resposta imunoinflamatória local ineficaz relacionada com a formação do granuloma. Há necessidade de alargar o estudo também ao LLBA.

Rev Port Pneumol 2005; XI (2): 111-133

Palavras-chave: Sarcoidose, diagnóstico laboratorial, granzima A, granzima B

the adjacent tissue and is surrounded by a mantle of lymphocytes, which mediate lysis of target cells by various mechanisms, including exocytosis of lytic proteins, perforins and granzymes.

Sarcoidosis laboratorial diagnosis is usually made by SACE and Lisozyme dosages. The granzymes A and B could be two other markers of the disease, since the sarcoidosis granuloma is rich in cytotoxic and NK cells.

An ELISA Kit was used to measure Granzyme A and B in serum of a normal control group (NC) (n=30), and in two groups with lung pathology: one without sarcoidosis, disease control (DC) (n=21) and other with sarcoidosis (S) (n=11).

Our results showed that SACE activity is significantly augmented in S group comparing with NC and DC, respectively: $82,6 \pm 32,7 / 31,9 \pm 17,8$ - $p=0,00017$ and $82,6 \pm 32,7 / 31,9 \pm 17,8$ - $p=0,00024$. Lisozyme activity is significantly augmented in S and DC groups comparing with NC. Granzyme B showed a significant decrease in DC and S groups comparing with NC. Granzyme A showed a significant decrease between S/NC groups.

Our results suggest that the decrease of Granzyme A and B in sarcoidotic patients could be related to an ineffective inflammatory local response related to the formation of sarcoidosis granulomas. More studies are needed, particularly in BAL.

Rev Port Pneumol 2005; XI (2): 111-133

Key words: Sarcoidosis, laboratorial diagnosis, granzyme A, granzyme B

Introdução

A sarcoidose é uma doença inflamatória crónica granulomatosa, multissistémica, de etiologia desconhecida, que pode afectar indivíduos em qualquer idade, embora se considere mais frequente na faixa etária dos 30-40 anos. Morfológicamente, caracteriza-se pela presença de granulomas epitelióides, bem delimitados por uma bainha celular onde se destacam linfócitos T^{1,2,3,4,5}.

Para a sua etiologia têm sido sugeridas várias hipóteses. Alguns autores apontam como hipótese mais provável a etiologia infecciosa por microrganismo não identificado, em que a sua permanência nos tecidos seria um requisito indispensável para a formação do granuloma²; outros sugerem uma etiologia imunológica em que a alteração da imunidade celular ou uma reacção tecidular não específica a diversos estímulos antigénicos, persistentes, estaria na origem da resposta imunoinflamatória responsável pela doença^{1,2,3}. Contudo, nenhuma das hipóteses está confirmada, mas torna-se cada vez mais consistente a existência de uma resposta imunitária celular exagerada a um grupo restrito de antígenos^{1,6}.

Em alguns estudos^{2,7,8} foi possível determinar algum grau de incidência familiar para a sarcoidose. Estudos efectuados em gémeos monozigóticos identificaram a existência de diversos factores genéticos que podem estar envolvidos na patogenia da doença^{2,8}, sugerindo que múltiplos genes possam interagir com um ou mais agentes ambientais, sendo responsáveis pelo início do processo que conduzirá à doença. Os factores genéticos alteram a susceptibilidade individual para a sarcoidose, o que se traduz num maior risco de incidência da patologia nos membros de uma mesma família, assim como

Introduction

Sarcoidosis is a chronic inflammatory granulomatous disease that is multisystemic and of unknown aetiology and which can affect individuals of any age, although the 30-40 year old range is considered most frequent. It is morphologically characterized by the presence of epithelioid granulomas that are well defined by a cellular sheaf with prominent lymphocyte T cells^{1,2,3,4,5}.

Various hypotheses have been suggested for its aetiology. Some authors claim the most probable explanation is an infectious aetiology by non-identified micro-organisms, in which its presence in tissues is an indispensable requirement for the formation of granuloma². Others suggest an immunological aetiology where alteration of cellular immunity or a non-specific tissue reaction to various persistent antigenic stimuli are the cause of the immunoinflammatory response responsible for the disease^{1,2,3}. Although none of the hypotheses are confirmed, it is becoming increasingly likely that an exaggerated immune cell response exists in a restricted group of antigens^{1,6}.

In some studies^{2,7,8} it was possible to determine some degree of family incidence for sarcoidosis. Studies carried out on monozygotic twins identified the existence of various genetic factors that could be involved in the pathogeny of the disease^{2,8}, suggesting that multiple genes could interact with one or more environmental agents, becoming responsible for the start of the process that leads to the disease. The genetic factors alter individual susceptibility to sarcoidosis, which translates into a higher risk of pathology incidence in members of the same family, which would justify higher incidence in determined racial groups^{2,6,7,8,9,10,11}.

A sarcoidose é uma doença inflamatória crónica granulomatosa, multissistémica, de etiologia desconhecida

Em alguns estudos foi possível determinar algum grau de incidência familiar para a sarcoidose

O granuloma epitelióide (...) não é (...) específico da sarcoidose

justificará a maior incidência em determinados grupos raciais^{2,6,7,8,9,10,11}. Por tudo isto, a sarcoidose é, também em termos genéticos, uma doença complexa.

A sua unidade patológica básica é o granuloma epitelióide, que não é, contudo, específico da sarcoidose. É uma reacção tecidular que se pode encontrar após exposição a um grande número de estímulos. O granuloma da sarcoidose, ao contrário do granuloma da tuberculose, não apresenta caseificação, sendo uma estrutura compacta constituída por um agregado de células mononucleares fagocíticas circundado por um *anel* de linfócitos T e de linfócitos B^{6,12,13,14}. Várias citocinas, como a interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6) e o factor de necrose tumoral (TNF- α), desempenham um papel importante na resposta inflamatória na sarcoidose. Trata-se de um perfil pró-inflamatório, dominado por uma polarização do tipo Th1 (subpopulação de linfócitos T “helper” 1)^{6,10,12,16}.

As estruturas granulomatosas, à medida que aumentam de tamanho, vão distorcendo a arquitectura normal dos órgãos, o que altera a sua função, dando origem às manifestações clínicas da doença. Como doença multissistémica, pode atingir qualquer órgão ou sistema. O pulmão é o órgão mais frequentemente atingido. Exemplos de outras localizações, igualmente frequentes, são os olhos, a pele e os gânglios linfáticos.

No pulmão, a presença de granulomas sarcoidóticos, ocupando espaço, distorce a parede dos vasos, dos alvéolos e dos brônquios, o que altera a funcionalidade da barreira alveolocapilar. Deste modo, surge a sintomatologia caracterizada, predominantemente, por um padrão ventilatório restritivo^{3,4}.

Sarcoidosis is, therefore, also a complex disease in genetic terms.

Its basic pathological unit is the epithelioid granuloma, which, however, is not specific to sarcoidosis. It is a tissue reaction that can be found after exposure to a large number of stimuli. Sarcoidosis granuloma, as opposed to tuberculosis granuloma, do not present caseation, and are instead a compact structure composed of an aggregate of mononuclear phagocyte cells surrounded by a ring of T lymphocytes and B lymphocytes^{6,12,13,14}. Various cytokines, such as interleukin 1 (IL1), interleukin 6 (IL6) and the tumour necrosis factor α TNF α play an important role in the inflammatory response in sarcoidosis. It is a pro-inflammatory profile dominated by polarization of type Th1 (subpopulation of T lymphocytes helper 1)^{6,10,12,16}.

Granulomatous structures in augmenting their size will distort the normal architecture of organs, altering their function and causing the clinical manifestations of the disease. As a multisystemic disease, it can reach any organ or system. The lung is the organ most frequently affected. Examples of other common locations are the eyes, skin and the lymph glands.

In the lung, the presence of sarcoidosis granuloma, occupying space, distorts the walls of blood vessels, the alveoli and the bronchus, which alters the functionality of the alveolocapillary barrier. In this way, symptomology emerges that is predominantly characterized by a restrictive ventilatory pattern^{3,4}.

In earlier stages there is interstitial pulmonary infiltration by typical sarcoidosis granulomas. Later, diffuse pulmonary fibrosis can be observed, appearing with classic

As estruturas granulomatosas, à medida que aumentam de tamanho, vão distorcendo a arquitectura normal dos órgãos, o que altera a sua função

Nos estádios mais precoces, há infiltração intersticial pulmonar por granulomas sarcoídóticos típicos. Mais tarde, pode observar-se fibrose pulmonar difusa, emergindo a sintomatologia, de que se destaca a dispneia^{6,17,18,19}.

É frequente o aparecimento de alterações de alguns parâmetros laboratoriais sanguíneos, como linfocitopenia, por vezes ligeira eosinofilia, aumento da velocidade de sedimentação eritrocitária, hipergamaglobulinemia, aumento da enzima de conversão da angiotensina sérica (SACE). Estas alterações, associadas às do órgão envolvido pela doença, são um auxiliar precioso no diagnóstico, juntamente com a radiologia, a clínica e a anatomia patológica^{3,4,20,21}.

Os parâmetros laboratoriais mais utilizados para o diagnóstico e a monitorização da sarcoidose pulmonar são o doseamento de SACE e da lisozima sérica, que, embora podendo apresentar falsos positivos e falsos negativos, se têm mostrado bons indicadores da doença. É desejável, em nosso entender, que outros marcadores surjam e possam contribuir para a optimização do diagnóstico e da monitorização desta doença, razão que justificou o interesse em desenvolver este estudo. Diversas enzimas têm sido apontadas como potenciais marcadores biológicos de várias doenças, como infecções virusais, doenças reumáticas, neoplasias malignas e também na rejeição de transplantes^{22,23}. As granzimas são um exemplo das enzimas a que se tem atribuído um papel biológico crescente na modulação de mecanismos fisiopatológicos em diversas entidades patológicas, no organismo humano. Assim, colocou-se a hipótese de que, também na fisiopatologia da sarcoidose, as granzimas pudessem ter algum papel, que, uma vez

symptomology of dyspnoea^{6,17,18,19}.

The appearance of alterations in some laboratory blood parameters, such as lymphocytopenia and sometimes light eosinophil, increases erythrocytic sedimentation rate, hypergammaglobulinemia and increase in serum angiotensin-converting enzyme (SACE).

These alterations associated to the organ involved in the disease are a valuable diagnostic help, together with radiology, clinical practice and pathological anatomy^{3,4,20,21}.

The most frequently used laboratory parameters for diagnosing and monitoring pulmonary sarcoidosis are measurement of SACE and levels of Lysozyme serum, which, although capable of presenting false positives and false negatives, have shown themselves to be good indicators of the disease. It is desirable, in our understanding, that other markers become known and which can contribute to the optimisation of diagnosis and monitoring of this disease - the reason justifying the need to develop this study. A number of enzymes have been identified as potential biological markers of various diseases, such as virus infections, rheumatic diseases, malignant neoplasia and also transplant rejection^{22,23}. Granzymes are an example of enzymes that have been given a growing biological role in the modulation of physiopathological mechanisms in various pathological entities in the human body. In this context, the hypothesis is advanced that in the physiopathology of sarcoidosis, granzymes could have a role, which when clarified could be valuable for diagnosis, treatment and monitoring of the disease. Granzymes are serine proteinase enzymes. Granzymes A and B are produced by cytotoxic T lymphocytes, by natural killer cells

É frequente o aparecimento de alterações de alguns parâmetros laboratoriais sanguíneos

As granzimas são um exemplo das enzimas a que se tem atribuído um papel biológico crescente na modulação de mecanismos fisiopatológicos

As granzimas são enzimas, proteinases de serina

esclarecido, poderá ser uma mais valia para o diagnóstico, para o tratamento e para a monitorização desta doença.

As granzimas são enzimas, proteinases de serina. As granzimas A e B são produzidas por linfócitos T citotóxicos, por células *natural killer*, e por polimorfonucleares neutrófilos (PMN). São armazenadas, como pró-enzimas, em grânulos citoplasmáticos, juntamente com perforinas, e, após a activação celular, são libertadas por exocitose no meio extracelular^{22,23,24,25,26}. As perforinas facilitam o acesso das granzimas aos seus substratos no interior das células-alvo, através da formação de poros transmembranares. A actuação concertada perforina/granzima conduz à morte por apoptose da célula-alvo e constitui uma das principais vias de morte celular, a par da via do Fas/Fas L^{26,27,28}.

Uma vez no interior das células-alvo, as granzimas vão interagir com substratos citosólicos, como por exemplo a *interleukine converting enzyme* (ICE), activam diversos processos bioquímicos e, desta forma, exercem as suas funções fisiopatológicas no organismo. Estão envolvidas na resposta imunitária ao cancro, na inflamação crónica granulomatosa e no processo de apoptose, por activação de uma via membranar e/ou pela via mitocondrial^{28,29}.

A granzima B induz apoptose por activação da via extrínseca ou membranar e, provavelmente também, pela via intrínseca ou mitocondrial, estando igualmente envolvida no processo de rejeição no transplante renal^{30,31,32,33}, enquanto a granzima A parece induzir a morte da célula por um mecanismo que envolve a disrupção da membrana e da função mitocondrial, por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido^{29,34}.

Um alvo importante da granzima A é um

and by polymorphonuclear neutrophils (PMN). They are stored, as proenzymes, in cytoplasmic granules, together with perforins, and, after cellular activation, are liberated by exocytosis, in the extracellular environment^{22,23, 24, 25, 26}. Perforins facilitate the access of granzymes to their substrates, inside the target cells, through the formation of porous transmembranes. The concerted perforin/granzyme action leads to death by apoptosis of the target cell constituting one of the main ways of cell death, on a par with Fas/Fas L^{26, 27, 28}.

Once inside the target cells, the granzymes will interact with cytosolic substrates, such as the interleukine converting enzyme (ICE), activating various biochemical processes, and thus exercise their physiopathological functions in the organism. They are involved in the immune response in cancer, in chronic granulomatous inflammation and in the process of apoptosis, through activation of a membrane path and/or by a mitochondrial channel^{28,29}.

Granzyme B induces apoptosis by activation of the extrinsic channel or membrane, and probably also by the intrinsic or mitochondrial channel, being equally involved in the process or renal transplant rejection^{30,31,32,33}, while granzyme A appears to induce cell death by a mechanism involving the disruption of the membrane and mitochondrial function by a mechanism that is still not totally defined^{29,34}.

An important target of granzyme A is a protein complex associated to endoplasmic reticulum called Complex SET, recently discovered, which intervenes in the repair of DNA and in the regulation of transcription, performing an important role in the response to repair in the face of oxidative

complexo proteico associado ao retículo endoplasmático designado Complexo SET, recentemente descoberto, que intervém na reparação do ADN e na regulação da transcrição, desempenhando um papel importante na resposta de reparação face ao *stress* oxidativo³⁴. Ao clivar três proteínas do complexo SET: a proteína SET, a proteína HMG-2 e a proteína Ape1, a granzima A activa a DNase (NM23-h1), inibe a capacidade da célula para reparar o dano; desta forma, a célula inicia o seu programa de morte³⁴.

Os linfócitos T, juntamente com os macrófagos, são os elementos celulares mais abundantes no granuloma sarcoidótico^{1,6,8}. É possível que a disposição periférica destas células se revista de algum significado morfofuncional na delimitação do processo inflamatório, modulando o *turnover* dos granulomas.

A presença de granzimas em meios biológicos extracelulares e em “líquidos de recolha”, como o líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA), pode interferir, de um modo significativo, com a resposta inflamatória, modulando-a. Por exemplo, a granzima A, no meio extracelular, aumenta a reacção inflamatória, activa os macrófagos por mecanismo desconhecido, participa na lise das células-alvo, modula a migração e o extravasamento de linfócitos T, participa na activação do plasminogénio e estimula a produção de diversas citocinas, como por exemplo o TNF- α , a IL6 e a IL8^{22, 26,35,36,37,38,39}. As granzimas A e B, no meio extracelular, podem estar envolvidas na destruição e na remodelação de tecidos, uma vez que actuam em várias proteínas da matriz extracelular^{22,40,41}.

Tendo em consideração a abundância de lin-

stress³⁴. On cleaving three proteins in the SET complex, the SET protein, the HMG-2 and the Ape1 protein, granzyme A activates the DNase (NM23-h1), inhibiting the capacity of the cell to repair the damage and thus the cell begins its death programme³⁴.

T lymphocytes, together with the macrophages, are the most abundant cell elements in sarcoidotic granulomas^{1,6,8}. It is possible that the peripheral disposition of these cells has some morphofunctional significance in the delimitation of the inflammatory process, modulating the turnover of granulomas. The presence of granzymes in extracellular biological spheres and in “specimen liquids”, such as bronchoalveolar lavage (BAL), could interfere significantly with the inflammatory response by modulating it. For example, granzyme A in an extracellular environment increases the inflammatory reaction, activates the macrophages by an unknown mechanism, participates in the lysis of target cells, modulates the migration and the extravasation of T lymphocytes, participates in the activation of plasminogenesis and stimulates the production of various cytokines, such as TNF- α , IL6 and IL8 for example^{22, 26, 35, 36, 37, 38, 39}. Granzymes A and B, in the extracellular environment, can be involved in the destruction and remodelling of tissue, as they operate in various proteins of the extracellular matrix^{22, 40, 41}.

Taking into consideration the abundance of T lymphocytes in the granuloma, with the A and B granzymes produced by these cells liberated by a process of degranulation and exocytosis during which they can be released in the extracellular environment^{22,42,43}, it is known that T lymphocyte activity can alter concentrations of granzymes A and B in serum, presenting the hypothesis that

As granzimas A e B, no meio extracelular, podem estar envolvidas na destruição e na remodelação de tecidos

fócitos T no granuloma; sendo as granzimas A e B produzidas por estas células, libertadas por um processo de desgranulação e exocitose durante o qual podem ser libertadas no meio extracelular^{22,42,43}; sabendo que a actividade linfocitária T pode alterar as concentrações das granzimas A e B no soro, colocou-se a hipótese de estas proteases poderem ser úteis como marcadores biológicos de doença. Por este motivo, propusemo-nos a fazer o doseamento da concentração sanguínea de granzimas A e B em doentes com sarcoidose pulmonar.

Objectivos

Os objectivos deste trabalho foram dosear a concentração de granzima A e de granzima B no soro de doentes com sarcoidose pulmonar, e avaliar o seu possível interesse como marcador laboratorial desta doença; paralelamente, dosear a SACE e a lisozima, utilizadas como “padrões” de reconhecido interesse laboratorial nesta patologia.

Material

Para atingir os objectivos, estudámos uma população constituída por 62 indivíduos, que aceitaram voluntariamente colaborar no estudo, dividida em três grupos:

Grupo-controlo saudável (CS): Constituído por 30 indivíduos de ambos os sexos, com idade média de 22 anos (mínima 18 anos - máxima 44 anos), sem queixas clínicas dignas de registo.

Grupo-controlo doente (CD): Que incluiu 21 indivíduos de ambos os sexos, com idade média de 63,9 anos (mínima 40 anos - máxima 87 anos), com patologia pulmonar infecciosa diversa, mas em todos os casos

these proteases can be useful as biological markers of the disease. For this reason, we proposed to measure blood concentration of granzymes A and B in patients with pulmonary sarcoidosis.

Objectives

The aims of this study were to measure the concentration of granzymes A and B in the serum of pulmonary sarcoidosis patients and evaluate their possible importance as a laboratory marker of this disease, while simultaneously measuring SACE and lysozyme, used as “patterns” of the recognized laboratorial importance in this pathology.

Material

To achieve the objectives we studied a group of 62 individuals who volunteered to take part in the study. They were divided into three groups:

Normal Control Group (NC): Composed of 30 subjects of both sexes with an average age of 22 years (minimum 18 – maximum 44), without significant clinical complaints.

Patient Control Group (PC): Composed of 21 individuals of both sexes with an average age of 63.9 years (minimum 40 – maximum 87), with diverse infectious pulmonary pathology, but in all cases without chronic granulomatous inflammation.

Patient Group (P): Composed of 11 individuals of both sexes with average age of 36.3 years (minimum 26 – maximum 64 years), with diagnosis of pulmonary sarcoidosis.

The patients were selected from among outpatients and inpatients of the Pulmonology Units of Coimbra University hospitals.

sem inflamação crónica granulomatosa.

Grupo-doente (D): Composto por 11 indivíduos de ambos os sexos, com idade média de 36,3 anos (mínima 26 anos - máxima 64), com diagnóstico de sarcoidose pulmonar.

Os doentes foram seleccionados da consulta e do internamento do Serviço de Pneumologia B dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Procedeu-se à recolha, por punção venosa periférica, de aproximadamente 8cc de sangue que se deixaram coagular à temperatura ambiente, após o que se procedeu à centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos, e, posteriormente, recolheu-se o soro.

Todas as amostras, devidamente identificadas, foram guardadas a -30°C até à sua utilização nos ensaios laboratoriais.

Métodos

Doseamento de granzima A e de granzima B

Usou-se, para este fim, uma técnica ELISA: *PeliKine compact*TM da CLB, um imunoensaio enzimático tipo *sandwich* em que a granzima existente na amostra é capturada pelo anticorpo monoclonal anti-granzima, que reveste os poços da microplaca.

Com o calibrador de concentração conhecida, traçou-se uma curva de calibração a partir das absorvâncias dos *standards*. A concentração de granzima (U/L) foi determinada por interpolação da densidade óptica (DO) com a referida curva.

Doseamento de SACE

Realizado por método espectrofotométrico cinético de cinco pontos, com substrato

Blood samples of approximately 8cc were taken from a peripheral vein and left to coagulate at room temperature before being placed in a centrifuge at 3,000r.m.p for 10 minutes, after which serum was collected.

All the duly labelled samples were kept at -30° until their use in our laboratory trials.

Methods

Measurement of Granzyme A and B

An ELISA technician used the following for this purpose: a CLB PeliKine Compact kit, an enzymatic immunotest of the sandwich type, in which the granzyme existing in the sample is captured by the anti-granzyme monoclonal antibody covering the pores of the microplate.

With the calibrator of concentration known, a calibration curve was drawn from the absorbance of standards. The concentration of granzyme (U/L) was determined by interpolation of optic density (OD) with the above curve.

Measurement of SACE

This was carried out by synthetic spectrophotometry of five points, with synthetic substratum N-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-phenylalanyl-glycylglycine (FAPGG) in accordance with the following reaction: FAPGG \rightarrow ACE \rightarrow FAP + Glycylglycine. FAPGG hydrolysis resulted in the decrease in absorbance of 340nm. SACE (U/L) activity in the sample is determined by taking the activity of the ACE calibrator into account.

Measurement of lysozyme

This was carried out by using the synthetic turbidimetric method at 546nm, with a bacterial suspension of micrococcus

sintético N-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-phenylalanyl-glycylglycine (FAPGG) de acordo com a seguinte reacção: FAPGG \rightarrow ACE \rightarrow FAP + Glycylglycine.

A hidrólise de FAPGG origina a diminuição na absorvância a 340nm. A actividade SACE (U/L) na amostra é determinada tendo em conta a actividade do calibrador da ACE.

Doseamento da lisozima

Fez-se por método turbidimétrico cinético a 546nm, com uma suspensão bacteriana de *Micrococcus lysodeicticus*. O resultado foi expresso em mg/L.

Análise estatística

Os resultados foram transferidos para uma folha de cálculo do *Microsoft Excel*TM, com o objectivo de proceder ao seu estudo/tratamento estatístico.

Os resultados foram apresentados usando os valores médios \pm desvio-padrão das amostras, utilizando para comparação de médias o teste *t* de “Student”, para análise entre dois grupos. A análise multivariada foi efectuada recorrendo à análise de regressão logística.

Considerou-se o valor de $p \leq 0,05$ estatisticamente significativo.

Resultados

Os resultados obtidos demonstram que a actividade SACE (U/L) está significativamente aumentada ($p < 0,05$) no grupo constituído por doentes com sarcoidose pulmonar (D) ($82,59 \pm 32,70$) quando comparada com a verificada no grupo controlo doente (CD) ($31,12 \pm 29,8$) e com a do grupo controlo saudável (CN) ($31,94 \pm 17,88$) (Fig. 1). A análise de regressão

lysodeicticus. The result was expressed in mg/L.

Statistical analysis

The results were transferred to a Microsoft Excel spreadsheet to proceed with statistical study/analysis.

The results were presented using average values \pm standard deviation of the samples, using the Student's t-Test to compare averages, for analysis between two groups. The multivariate analysis was made by resorting to evaluation of logistic regression.

The value $p \leq 0,05$ was considered statistically significant.

Results

The results obtained demonstrated that SACE (U/L) activity is significantly increased ($p < 0,05$) in the group of patients with pulmonary sarcoidosis (P) ($82,59 \pm 32,70$) when compared with that seen in the patient control group (PC) ($31,12 \pm 29,8$) and with the healthy control group (NC) ($31,94 \pm 17,8$), (Fig. 1). The analysis of logistic regression showed the same type of variation in SACE values. The fact that no significant variation in SACE was observed when compared to activity in the patient and healthy control groups allows us to suggest, in accordance with that published, that the SACE is a good laboratory marker of pulmonary sarcoidosis.

Lisozyme activity (mg/L), studied individually, showed a significant increase in group (P) ($12,5 \pm 5,4$), and in group (PC) ($9,7 \pm 3,8$) in comparison to that observed in group (NC) ($7,5 \pm 1,9$) (Fig. 2).

The analysis of logistic regression shows that this enzyme presents significant alterations

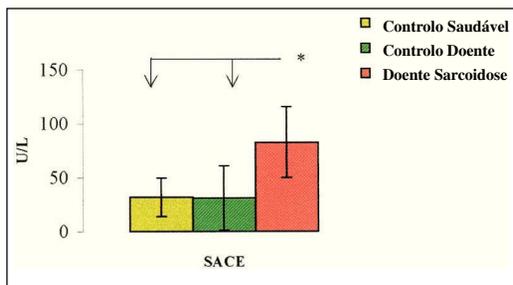


Fig. 1 – Representação gráfica da actividade média da SACE (U/L). A actividade enzimática foi determinada por espectrofotometria, as leituras foram efectuadas a um comprimento de onda de 340 nm. É possível observar que no grupo constituído pelos doentes com sarcoidose (Doente Sarcoidose) há aumento estatisticamente significativo ($p < 0.05$) da actividade ACE (82.59 ± 32.70) comparativamente ao grupo Controlo Saudável (31.94 ± 17.88) e ao grupo Controlo Doente (31.12 ± 29.8).

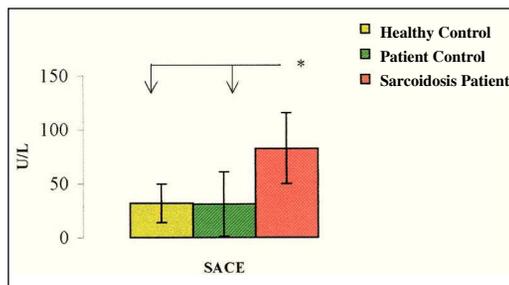


Fig. 1 – Graphic representation of average SACE (U/L) activity. Enzyme activity was determined by spectrophotometry; readings were made using a wavelength of 340 nm. It can be observed that the group of sarcoidosis patients (Sarcoidosis Patient) has increased statistical significance ($p < 0.05$) of ACE activity (82.59 ± 32.70) compared to the behaviour of the Healthy Control group (31.94 ± 17.88) and the Patient Control group (31.12 ± 29.8).

logística demonstra o mesmo tipo de variação de valores de SACE. O facto de não se observar nenhuma variação significativa de SACE quando se compara a actividade no grupo controlo doente e no grupo de controlo saudável permite-nos sugerir, de acordo com o publicado, que a SACE é um bom marcador laboratorial de sarcoidose pulmonar.

A actividade da lisozima (mg/L), estudada individualmente, demonstrou aumento significativo no grupo (D) (12.5 ± 5.4) e no grupo (CD) (9.7 ± 3.8), comparativamente com o observado no grupo (CN) (7.5 ± 1.9) (Fig. 2).

A análise de regressão logística demonstrou que esta enzima apresenta alterações significativas da sua actividade no decurso de patologia pulmonar não sarcoidótica, o que poderá indiciar que a lisozima possa constituir um marcador laboratorial útil de patologia pulmonar, em geral, podendo ser um bom auxiliar ao diagnóstico diferencial

of its activity in the course of non-sarcoidotic pulmonary pathology, indicating that lysozyme might constitute a useful laboratory marker of pulmonary pathology in general, and could be a good aid to differential diagnosis between sarcoidosis and non-sarcoidotic pulmonary pathology.

The concentration of granzyme A (U/L) shows significant reduction in the group (P) (81.4 ± 17.7) compared to that confirmed in group (NC) (108.0 ± 38.3). When an analysis of this isolated variable was made, (Fig. 3), however, analysis of logistic regression did not reveal any difference in its concentration in any of the conditions analysed.

Analysis of concentration of granzyme B (Fig. 4) showed that its (U/L) concentration in groups (P) (1169 ± 23.5) and (PC) (117.0 ± 30.2) was significantly reduced when compared to the concentration observed in group (NC) (135.2 ± 36.5). Analysis of logistic regression did not confirm these changes.

DOSEAMENTO DAS GRANZIMAS A E B NA SARCOIDOSE PULMONAR (ESTUDO EXPERIMENTAL)

Marília Dourado, Joana Bento, Luís Mesquita, Alcide Marques, Sofia Vale-Pereira, Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Anabela Mota Pinto

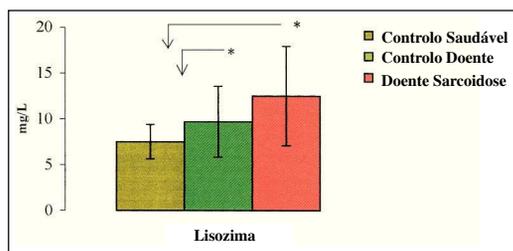


Fig. 2 – Representação gráfica da actividade média da lisozima (mg/L). A actividade enzimática foi determinada por turbidimetria; as leituras foram efectuadas a um comprimento de onda de 546 nm. É possível observar que no grupo constituído por doentes com sarcoidose (Doente Sarcoidose) ($12,5 \pm 5,4$) e no grupo constituído por doentes com patologia pulmonar sem componente granulomatosa (Controlo Doente) ($9,7 \pm 3,8$), há aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da actividade enzimática comparativamente com o grupo Controlo Saudável ($7,5 \pm 1,9$). Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Doente Sarcoidose e Controlo Doente.

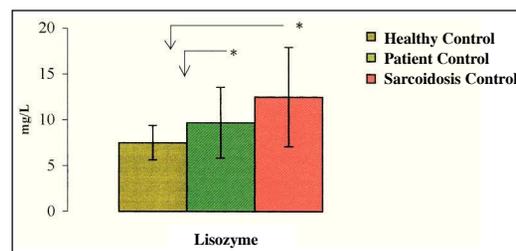


Fig. 2 – Graphic representation of average lysozyme activity (mg/L). Enzyme activity was determined by turbidimetry; readings were made using a wavelength of 456 nm. It can be observed that in the group of sarcoidosis patients (Sarcoidosis Patient) (12.5 ± 5.4) and in the group of patients with non-granulomatous pulmonary pathology (Patient Control) (9.7 ± 3.8) there is a significant statistical increase ($p < 0.05$) in enzyme activity compared to the healthy control group (7.5 ± 1.9). There were no significant differences observed between the Sarcoidosis Patient and Patient Control groups.

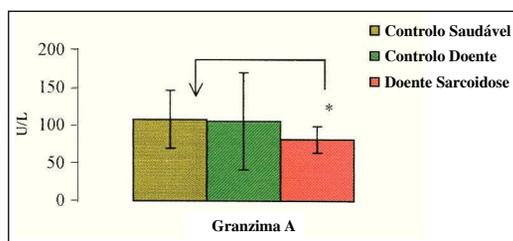


Fig. 3 – Representa-se na forma gráfica a concentração média da granzima A expressa em U/L e determinada por ELISA. Como se pode observar, no grupo designado por Doentes Sarcoidose há diminuição, com significado estatístico ($p < 0,05$) da concentração da granzima A ($81,4 \pm 17,7$), quando comparada com a observada no grupo Controlo Saudável ($108,0 \pm 38,3$). Relativamente ao grupo Controlo Doente, não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

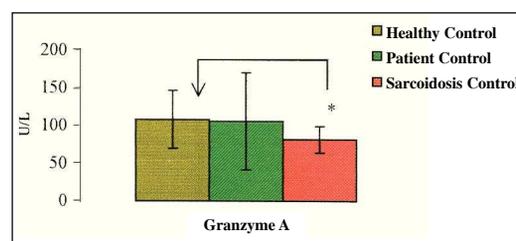


Fig. 3 – Graphic representation of average concentration of granzyme A expressed in U/L and determined by ELISA. As can be observed, in the Patient Sarcoidosis group there is a reduction with statistical significance ($p < 0.05$) in the concentration of granzyme A (81.4 ± 17.7) when compared to that observed in the Healthy Control group (108.0 ± 38.3). In relation to the Patient Control group there were no significant statistical differences observed.

entre sarcoidose pulmonar e patologia pulmonar não sarcoidótica.

A concentração da granzima A (U/L) demonstrou diminuição significativa no grupo (D) ($81,4 \pm 17,7$), comparativamente com o verificado no grupo (CN) ($108,0 \pm 38,3$) quando se fez a análise desta variável isola-

Discussion

The diagnosis of pulmonary sarcoidosis, not always easy, requires a combination of clinical data and various auxiliary diagnostic methods. However, none of the available biological markers is specific to sarcoidosis so as to individually allow diagnosis or exact

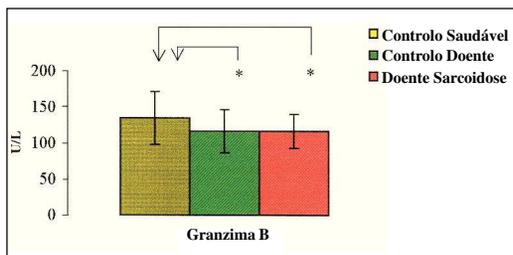


Fig. 4 – Representa-se na forma gráfica a concentração média da granzima B expressa em U/L e determinada por ELISA. Como se pode observar, a concentração da granzima B nos grupos designados por Doentes Sarcoidose ($116,9 \pm 23,5$) e Controlo Doente ($117,0 \pm 30,2$) apresenta diminuição, com significado estatístico ($p < 0,05$), quando comparada com a determinada no grupo Controlo Saudável ($135,2 \pm 36,5$). A comparação da concentração da granzima B dos grupos Doente Sarcoidose e Controlo Doente não demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

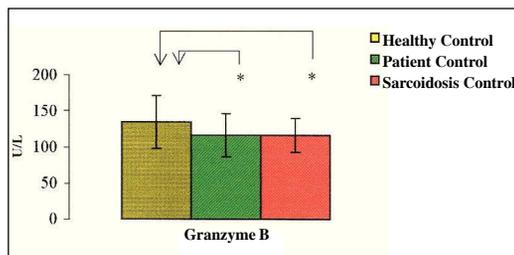


Fig. 4 – Graphic representation of average concentration of granzyme B expressed in U/L and determined by ELISA. As can be observed, the concentration of granzyme B in the Sarcoidosis Patient (1169 ± 23.5) group and Healthy Control group (117.0 ± 30.2) present significantly significant reduction ($p < 0.05$) when compared to that of the Healthy Control group (135.2 ± 36.5). The comparison of concentration of granzyme B in the Sarcoidosis Patient and Patient Control groups did not demonstrate statistically significant differences.

damente (Fig. 3); no entanto, a análise de regressão logística não revelou nenhuma diferença significativa da sua concentração em nenhuma das condições analisadas.

A análise da concentração de granzima B (Fig. 4) demonstrou que a sua concentração (U/L) nos grupos (D) ($116,9 \pm 23,5$) e (CD) ($117,0 \pm 30,2$) está significativamente diminuída quando comparada com a concentração observada no grupo (CN) ($135,2 \pm 36,5$). A análise de regressão logística não confirmou estas alterações.

Discussão

O diagnóstico de sarcoidose pulmonar, nem sempre fácil, requer a combinação dos dados clínicos e dos diversos meios auxiliares de diagnóstico. No entanto, nenhum dos marcadores biológicos disponíveis é específico de sarcoidose de modo a, isoladamente, permitir fazer o diagnóstico ou previsões prognósticas exactas^{44,45}. Eles são a expressão

prognostic predictions^{44,45}. They are the biological expression of the psychopathological mechanisms of the disease. They reflect, among other things, alterations in cellular functions involved in the formation of sarcoidotic granulomas⁴⁵.

In recent decades, efforts have been made that have resulted in some advances, leading to an improvement in the laboratory contribution to the diagnosis of sarcoidosis, with increasing and accessible resort to BAL analysis, which allows us to obtain information very close to the local activity of the lesion. However, measurement of SACE and serum lysozyme are still used when, in clinical practice, the laboratory diagnosis of sarcoidosis is required. These biological markers are too often used as “patterns” of recognized interest in investigative studies into and experiments in this pathology. The angiotensin-converting enzyme (ACE) is one of the most important biological markers in this pathology. This enzyme,

O diagnóstico da sarcoidose pulmonar, nem sempre fácil, requer a combinação dos dados clínicos e dos diversos meios auxiliares de diagnóstico

biológica dos mecanismos fisiopatológicos da doença. Reflectem, entre outras, as alterações das funções celulares implicadas na formação dos granulomas sarcoidóticos⁴⁵. Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos esforços de que resultaram alguns avanços que permitiram melhorar o contributo laboratorial para o diagnóstico da sarcoidose, com o recurso cada vez mais frequente, e acessível, ao LLBA, cuja análise nos permite obter informações muito próximas da actividade local da lesão. Contudo, é ainda o doseamento de SACE e de lisozima no soro que é usado quando, na prática clínica, se pretende diagnosticar laboratorialmente a sarcoidose. Estes marcadores biológicos são, igualmente, muito utilizados como “padrões” de reconhecido interesse em estudos de investigação, experimentais, sobre esta patologia.

A enzima de conversão da angiotensina (ACE) é um dos marcadores biológicos de maior importância nesta patologia. Esta enzima, que cataliza a transformação de angiotensina I em angiotensina II, é, em condições fisiológicas, maioritariamente segregada pelas células do endotélio vascular. No decurso da sarcoidose, a ACE, é também produzida por células da linha monocitária e pelas células epitelióides do granuloma. Os linfócitos T CD4 interferem com a secreção da enzima ao produzir e segregar o factor indutor da ACE, o AIF (ACE-inducing factor)⁴⁵, o que contribui para o aumento da sua concentração.

O doseamento de SACE tem demonstrado ser um bom “marcador” laboratorial na sarcoidose, uma vez que a actividade da enzima de conversão da angiotensina se encontra significativamente elevada no soro dos doentes com esta patologia, comparati-

which catalyses the transformation of angiotensin I in angiotensin II, is, in physiological conditions, largely segregated by the cells of the vascular endothelium. In the course of sarcoidosis, ACE is also produced by cells of the monocyte line and by epithelioid cells of the granulomas. T lymphocytes CD4 interfere with the secretion of enzyme in the production and separation of the inductor factor of ACE, AIF (ACE-inducing factor)⁴⁵, which contribute to an increase in its concentration.

Measurement of SACE has been shown to be a good laboratory marker in sarcoidosis as the activity of the angiotensin-converting enzyme is found to be significantly elevated in the serum of patients with this pathology, compared to what is observed in normal control subjects and in patients with inflammatory non-granulomatous pulmonary pathology, in varying degrees, according to studies, of between 40%-90% of cases^{20,45,46,47,48,49}. As previously stated, this fact is due to the large production and secretion of the enzyme by the epithelioid cells of sarcoidotic granulomas⁵. Peeters ACTM *et al* 1998⁵⁰ found that SACE influences production of pro-inflammatory cytokines, which, according to the authors and in accordance with what is currently accepted, could contribute to the development of granulomas, as their serum measurement is a good indicator of inflammatory activity in sarcoidosis^{44,45}.

Results obtained in this study demonstrated a significantly statistical increase in SACE activity ($p < 0.05$) in the group of patients with pulmonary sarcoidosis compared to that observed in the normal control group and the group of patients with non-granulomatous pulmonary pathology, as can be

O doseamento de SACE tem demonstrado ser um bom “marcador” laboratorial na sarcoidose

vamente com o que se observa em controlos normais, e em doentes com patologia pulmonar inflamatória não granulomatosa, numa percentagem que varia, consoante os estudos, entre 40-90% dos casos^{20,45,46,47,48,49}. Este facto deve-se, como já foi referido, à grande produção e à secreção da enzima pelas células epitelióides do granuloma sarcoidótico⁵. Peeters ACTM e col., 1998⁵⁰, verificaram que a SACE influenciava a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que, segundo os autores e de acordo com o que é aceite actualmente, poderá contribuir para o desenvolvimento do granuloma, sendo o seu doseamento sérico um bom indicador da actividade inflamatória na sarcoidose^{44,45}.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram aumento estatisticamente significativo da actividade SACE ($p < 0,05$) no grupo de doentes com sarcoidose pulmonar, comparativamente com o observado no grupo controlo normal e com o grupo constituído por doentes com patologia pulmonar não granulomatosa, como se pode concluir pela observação da Fig. 1. A maior actividade SACE nos doentes com sarcoidose está de acordo com os resultados de outros autores^{20,21,45,48,51}, estando relacionada com a actividade da doença, uma vez que tanto o grupo controlo constituído por indivíduos saudáveis, como o grupo constituído por doentes com patologias pulmonares sem inflamação crónica granulomatosa, apresentam actividade SACE idêntica e significativamente mais baixa. A análise de regressão logística (análise multivariada) indica que a SACE é o marcador laboratorial disponível que mais contribui para o diagnóstico laboratorial de sarcoidose pulmonar.

A lisozima é uma enzima catiónica produzida

seen in graph 1. The higher SACE activity in sarcoidosis patients is in keeping with the findings of other authors^{20,21, 45, 48, 51} related to the activity of the disease, as so many in the control group of healthy subjects and the group of patients with non-inflammatory chronic granulomatous pulmonary pathology presented identical and significantly lower SACE activity. Analysis of logistic regression (multivaried analysis) indicates that SACE is the available laboratory marker that contributed most to the laboratory diagnosis of pulmonary sarcoidosis.

Lisozyme is a cationic enzyme produced by monocyte, macrophage and granulocyte cells. It has preferential antibacterial activity not only as it catalyses hydrolysis of mucopolysaccharides of the bacterial walls, especially gram-positives, but also as it complements the lytic action of the object. Additionally, it is accepted that the enzyme can perform other functions in the organism, many of which are poorly understood or clarified, as for example in the psychopathology of inflammatory diseases, as it is produced and released by immunoinflammatory cells in the area of inflammation. Lisozyme activity has been pointed to as a marker of inflammatory activity, with use in the laboratory in the diagnosis of some pulmonary diseases. It is particularly valuable in the relation between lisozyme in pleural liquid/activity of serum lisozyme differential diagnosis in pleural effusions caused by tuberculosis^{45, 46}.

The analysis of results of lisozyme activity in this study shows, Fig. 2, in comparisons between groups a statistically significant increase in the sarcoidosis patients and the group with various pulmonary diseases without inflammatory components, in relation to that observed in the healthy control group

A lisozima é uma enzima catiónica produzida por células da linha monocítica/macrofágica e granulocítica

por células da linha monocítica/macrofágica e granulocítica. Possui actividade antibacteriana preferencial não só porque cataliza a hidrólise de mucopolissacarídeos da parede bacteriana, sobretudo de Gram-positivos, mas também porque complementa a acção lítica do complemento. Além desta, aceita-se que a enzima possa desempenhar outras funções no organismo, muitas das quais mal conhecidas ou mal esclarecidas, como por exemplo na fisiopatologia de doenças inflamatórias, uma vez que é produzida e libertada por células imunoinflamatórias presentes no local da inflamação. A actividade da lisozima tem sido indicada como um marcador de actividade inflamatória com utilidade laboratorial no diagnóstico de algumas doenças pulmonares. É particularmente valorizada a razão entre actividade da lisozima no líquido pleural/actividade da lisozima sérica para o diagnóstico diferencial de derrames pleurais de origem tuberculosa^{45,52}.

A análise dos resultados da actividade da lisozima neste trabalho demonstrou (Fig. 2), na comparação entre grupos, aumento estatisticamente significativo no grupo de doentes com sarcoidose e com doença pulmonar diversa sem componente inflamatória, relativamente ao observado no grupo controlo saudável ($p < 0,05$). Não se encontrou diferença significativa quando se comparou a actividade determinada no grupo de doentes com sarcoidose com a do grupo de doentes com patologia pulmonar diversa. O aumento da actividade da lisozima em ambos os grupos constituídos por doentes com patologia pulmonar diversa e com sarcoidose pulmonar comparativamente com o observado nos indivíduos saudáveis, sugere que o doseamento da

($p < 0,05$). There was no significant difference when determined activity was compared in the group of sarcoidosis patients with the group with varying pulmonary pathology. The increase in lysozyme activity in both groups of patients with varying pulmonary pathology and with pulmonary sarcoidosis, compared to that observed in healthy subjects, suggest that measuring lysozyme activity could be used as a good indicator of pulmonary illness in general. The increase observed by us, in accordance with other authors, does not add any information to the diagnosis of sarcoidosis⁴⁵. On the other hand, analysis of logistic regression (multivaried analysis) suggests that, in patients with pulmonary sarcoidosis, the heightened activity of serum lysozyme could be an indicator of protection or of less serious disease.

Serum concentration of granzyme A presented a significant statistical reduction ($p < 0,05$) in the group of patients with sarcoidosis, compared to that shown in the healthy control group, as can be seen in Fig. 3.

In Fig. 4, referring to the measurement of serum concentration of granzyme B, we can observe that concentration of granzyme B is diminished, with a significant statistical difference ($p < 0,05$), both in patients with sarcoidosis and in those with non-granulomatous pulmonary pathology, compared to the normal control group.

The granzymes are serum proteases released by the degranulation of T lymphocytes and natural killer cells that penetrate the target cell and, in its cytosol, carrying out their functions, among which we highlight the stimulation of production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL6 and IL8

actividade da lisozima poderá ser usada como um bom marcador de doença pulmonar em geral. De acordo com outros autores, o aumento, por nós observado, não acrescentou nenhuma informação para o diagnóstico de sarcoidose⁴⁵. Por outro lado, a análise de regressão logística (análise multivariada) sugere que, nos doentes pulmonares sem sarcoidose, a maior actividade sérica de lisozima poderá constituir um indicador de protecção ou de doença menos grave.

A concentração sérica da granzima A apresentou diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo constituído por doentes com sarcoidose, comparativamente ao verificado no grupo de controlo saudável, como se pode observar na Fig. 3.

Na Fig. 4, que se refere ao doseamento da concentração sérica da granzima B, podemos observar que a concentração da granzima B está diminuída, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), tanto nos doentes com sarcoidose como nos doentes com patologia pulmonar não granulomatosa, comparativamente com o grupo controlo normal.

As granzimas são serinaproteases libertadas por desgranulação dos linfócitos T e de células *natural killer*, penetram na célula-alvo e, no seu citosol, vão executar as suas funções, de que destacamos a estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL6 e IL8 e a indução da morte celular programada^{22,27,28,53}. A granzima B conduz à morte da célula-alvo por apoptose por uma via membranar ou extrínseca, ou através da via mitocondrial ou intrínseca. Esta última via é mediada pela clivagem dum substrato desta granzima, a proteína citosólica Bid, um membro da família de proteínas

and the induction of programmed cellular death^{2,27,28,53}. Granzyme B causes the death of the target cell by apoptosis through a membrane or extrinsic channel, or via the mitochondrial or intrinsic channel. This last channel is mediated by cleaving of the substrate of this Granzyme, the cytosolic protein, Bid, a member of the pro-apoptotic protein family Bcl-2. This cleaving results in the creation of a truncated form of Bid, Bidt, that induces change in the mitochondrial membrane with the freeing of cytochrome c and other pro-apoptotic mediators, culminating in the activation of caspases and in cell death by apoptosis^{53,54}. Granzyme A also induces cell death, but by mechanisms still not totally explained^{29,34,55}. Not all liberated granzymes enter the target cell. Some pass into peripheral blood and other biological liquids and specimens, such as BAL^{22,42,56,57}, which suggest the possibility that in these areas they exercise a modulating effect on the organism^{37,38}. Their measurement, especially by the technique used in this study, could be useful, for example, as an aid to diagnosis in clinical practice.

The presence of granzymes A and B in the extracellular environment leads us to acknowledge the possibility of these modulating the immunoinflammatory response observed in various pathological situations, as for example in sarcoidosis, which is in keeping with the study of Spaeny-Dekking *et al*/1998⁴² where the hypothesis is advanced that Granzyme levels in biological liquids could reflect the presence of activated cells (NK and cytotoxic LT) and in this way the degree and severity/activity of the disease⁴². Elevated levels of Granzyme A and B were found in plasma of patients with EBV and

As granzimas são serinaproteases libertadas por desgranulação dos linfócitos T e de células natural killer

pró-apoptóticas Bcl-2. Desta clivagem resulta a formação da forma truncada da Bid, a Bidt, que induz alteração na membrana mitocondrial com libertação de citocromo c e outros mediadores pró-apoptóticos, culminando na activação de caspases e na morte da célula por apoptose^{3,54}. A granzima A também induz a morte celular, mas por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos^{29,34,55}.

Nem todas as granzimas libertadas entram na célula-alvo. Parte passa ao sangue periférico e a outros líquidos biológicos e de recolha, como o LLBA^{22,42,56,57}, o que sugere a possibilidade de, nestes compartimentos, exercerem algum efeito modulador no organismo^{37,38}. O seu doseamento, nomeadamente pela técnica usada neste estudo, poderá ser utilizado, por exemplo, como auxiliar de diagnóstico na prática clínica.

A presença de granzimas A e B no meio extracelular levou-nos a admitir a possibilidade de estas modularem a resposta imunoinflamatória observada em diversas situações patológicas, como por exemplo na sarcoidose, o que estaria de acordo com o estudo de Spaeny-Dekking e col., 1998⁴², em que é avançada a hipótese de os níveis de granzimas dos líquidos biológicos poderem reflectir a presença de células activadas (NK e LT citotóxicos), e, deste modo, o grau e a gravidade/actividade da doença⁴². Níveis elevados de granzima A e B foram detectados no plasma de doentes com infecção por EBV e VIH-1 no líquido sinovial e no plasma de doentes com artrite reumatóide e também no LLBA de doentes com alveolite linfocítica e com pneumonite por hipersensibilidade (PH). Na PH, a granzima A apresentou a maior actividade, pelo que os autores a referem como tendo maior partici-

HIV-1, in sinovial liquid and in those with rheumatoid arthritis and also in the BAL of patients with lymphocytic alveolitis and with hypersensitivity pneumonitis (HP). In HP, Granzyme A presented the most activity, with the authors referring to it as having more participation in its physiopathological mechanisms.^{22,42,56,57}. The same authors also assert that the activity of Granzyme A is strongly related to levels of antigens in the BAL which, in their opinion, indicates that all the Granzyme A in the lung is active granzyme²².

On the other hand, a study by Bratke K *et al*, 2004⁴³ showed that bronchial asthma patients had measurements of granzyme B taken in BAL that were significantly higher compared to those found in normal control subjects. The authors suggest that in this pathological condition, granzyme B performs a distinct physiopathological role, which in their opinion needs to be confirmed⁴³.

Our results suggest the participation of both granzyme A and B in the mechanisms of cellular cytotoxicity observed in sarcoidosis, which is in accord with some authors who attribute an active role to these enzymes in the physiopathological modulation of the lung²². The reduction in serum concentration of granzyme A and B could be related to the greater use /consumption of this enzyme, or due to its deficient cellular activation as a reflex of its production and, mainly, in the deregulation of the local cellular response.

However, despite these variables, when evaluated separately and the different groups compared, they presented significant statistical differences, previously referred to in Figs. 3 and 4, which could suggest some relation to the formation of sarcoidotic

pação nos seus mecanismos fisiopatológicos^{22,42,56,57}. Os mesmos autores afirmam ainda que a actividade da granzima A está fortemente correlacionada com os níveis antigénicos no LLBA, o que, em sua opinião, indica que toda a granzima A, no pulmão, é uma granzima activa²².

Por outro lado, noutra estudo, Bratke K e col. 2004⁴³, em doentes com asma brônquica, foi doseada a concentração da granzima B em LLBA, tendo-se observado aumento significativo nos doentes, comparativamente com o encontrado nos controlos normais. Os autores sugerem que, nesta condição patológica, a granzima B desempenha um papel fisiopatológico de relevo, o que, no entanto, em sua opinião, necessita de ser confirmado⁴³.

Os nossos resultados sugerem a participação quer da granzima A quer da granzima B nos mecanismos de citotoxicidade celular observados na sarcoidose, o que está de acordo com alguns autores que atribuem a estas enzimas um papel activo na modulação fisiopatológica do pulmão²². A diminuição da concentração sérica da granzima A e B poderá estar relacionada com a maior utilização/consumo desta enzima, ou dever-se a uma activação celular deficiente com reflexo na sua produção e, principalmente, na desregulação da resposta celular local.

No entanto, apesar de estas variáveis, quando avaliadas separadamente e feita a comparação entre os diferentes grupos, terem apresentado diferenças estatisticamente significativas, referidas nas Figs. 3 e 4, o que poderá sugerir alguma relação com a formação do granuloma sarcoidótico, através da análise de regressão logística, não foi possível confirmar esta relação, o que pode estar relacionado com a amostra incluída neste

granulomas. Through the analysis of logistic regression it was not possible to confirm this relation, which could relate to the sample of this study being insufficient. However, the serum concentration of granzyme B presents changes, which although without significance tended to approximate to the statistical significance of the patient control group when compared to the healthy control group.

Although promising, these results need to be confirmed, as given the smallness of the sample, it is not possible to draw final, illuminating conclusions. A larger sample and the widening of the study is suggested, which could alter this result and make it possible that granzyme B is revealed to be a useful laboratory marker in pulmonological diagnosis. In our opinion, there is a need for further studies that must also include measurements of enzymes in BAL to gather locally obtained information on the development of the chronic inflammatory process.

Conclusions

In conclusion, with the sample considered, our study showed that SACE activity in patients with sarcoidosis is significantly increased in relation to what we observed in other groups under study, in accordance with available literature. This allowed us to conclude, and reaffirm, the importance of measuring this enzyme, and its important contribution to diagnosis and laboratory monitoring of sarcoidosis.

Lisozyne activity shows alterations in the course of infectious, non-granulomas pulmonary pathologies, which suggest their possible usefulness for differential diagnosis between pulmonary sarcoidosis and non-

Os resultados sugerem a participação quer da granzima A quer da granzima B nos mecanismos de citotoxicidade celular observados na sarcoidose

estudo ser insuficiente. No entanto, a concentração sérica de granzima B apresenta alterações que, embora sem significado, tendem a aproximar-se da significância estatística no grupo “controlo doente” quando comparada com a do grupo “controlo saudável”.

Estes são resultados que, embora prometedores, necessitam de confirmação, uma vez que, dada a exiguidade da amostra, não é possível retirar conclusões finais, elucidativas. Sugere-se o aumento da amostra e a ampliação do estudo, o que poderá alterar este resultado, sendo, por isso, possível que a granzima B se venha a revelar um marcador laboratorial útil no diagnóstico em pneumologia. Em nossa opinião, são necessários mais estudos que deverão incidir, também, nos doseamentos das enzimas em LLBA para que, desta maneira, se possam recolher informações sobre a evolução do processo inflamatório crónico, obtidas localmente.

Conclusões

Em conclusão, com a amostra estudada, o nosso estudo demonstrou que a actividade SACE nos doentes com sarcoidose está significativamente aumentada, em relação ao que observámos nos outros grupos estudados, de acordo com o publicado na literatura disponível, o que nos permite concluir, e reafirmar, o interesse do doseamento desta enzima e o seu contributo importante para o diagnóstico e monitorização laboratorial da sarcoidose.

A actividade da lisozima demonstrou alterações no decurso de patologias pulmonares não granulomatosas, infecciosas, que sugerem a sua possível utilidade para o diagnóstico diferencial entre sarcoidose pulmonar e patologia pulmonar não sarcoidótica.

sarcoidotic pulmonary pathology.

The change in concentration of granzymes A and B, despite the statistical significance when they are analysed individually, does not allow for the drawing of conclusions, although it appears to us that in this study the granzymes are not important for diagnosis of pulmonary sarcoidosis. However, their possible use in the diagnosis of pulmonology cannot be ruled out.

Finally, we conclude with the need to widen the study, increasing the number in the sample and the necessity of subjecting them to measurement of BAL to give further clarification to our results.

Work financed by the Research Support Department (GAI) of the Coimbra University Medical School

A actividade SACE nos doentes com sarcoidose está significativamente aumentada

A modificação da concentração das granzimas A e B, apesar do significado estatístico, quando analisadas individualmente, não permitem tirar conclusões, embora nos pareça que, neste estudo, com a amostra estudada, as granzimas não são importantes para o diagnóstico de sarcoidose pulmonar. Contudo não se pode afastar a sua possível utilidade no diagnóstico em pneumologia. Finalmente, concluímos pela necessidade de alargar o estudo, aumentar o número da amostra e pela necessidade de se procederem a doseamento em LLBA para melhor esclarecimento dos nossos resultados.

Projecto financiado pelo Gabinete de Apoio à Investigação (GAI) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Bibliografia/Bibliography

1. Anders Eklund, Aetiology, pathogenesis and treatment of sarcoidosis. *J Inter Med* 2003;253:2-3.
2. RM Du Bois, Goh N, McGrath D, Cullinan P. Is there a role for microorganisms in the pathogenesis of sarcoidosis? *J Int Med* 2003;253:4-17.
3. Neville Woolf. Some specific granulomatous disorders. In: *Pathology - Basic and Systemic*. London: WB Saunders Company Ltd; 1998. Ch:15; p. 157-172.
4. Alan Stevens, James Lowe. Tissue responses to damage. In: *Pathology*. 2nd ed. Edinburgh: Mosby; 2000. Ch: 4; p. 35-60.
5. Manfred Schürmann, Reichel P, Müller-Myhsok B, Dieringer T, Wurm K, Schlaak M et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms and familial occurrence of sarcoidosis. *J Int Med* 2001; 249:77-83.
6. Manfred W Ziegenhagen, Müller-Quernheim J. The cytokine network in sarcoidosis and its clinical relevance. *J Int Med* 2003;253:18-30.
7. Benjamin A Rybicki, Major M, Popovich JJr, Maliarik MJ, Iannuzzi MC. Racial differences in sarcoidosis incidence: a 5-year study in a health maintenance organization. *Am J Epidemiol* 1997;145(3):234-241.
8. DS McGrath, Daniil Z, Foley, du Bois JL, Lympany PA, Cullinan P, du Bois RM. Epidemiology of familial sarcoidosis in the UK. *Thorax* 2000;55:751-754.
9. Benjamin A Rybicki, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossman MD, Bresnitz EA, et al. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Resp Crit Care Med* 2001;164:2085-2091.
10. J Müller-Quernheim. Sarcoidosis: immunopathogenetic concepts and their clinical application. *Eur Resp J* 1998;12(3):716-738.
11. M Luisetti, Beretta A, Casali L. Genetic aspects in sarcoidosis. *Eur Resp J* 2000;16(4): 768-780.
12. David R Moller. Treatment of sarcoidosis – from a basic science point of view. *J Int Med* 2003;253:31-40.
13. Yeager HJr, Williams MC, Beekman JF, Bayly TC, Beaman BL. Sarcoidosis: analysis of cells obtained by bronchial lavage. *Am Rev Resp Dis* 1977;116: 951-954.
14. Gary W Hunninghake, Crystal RG. Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N Engl J Med* 1981;305(8):429-434.
15. Agostini C, Semenzato G. Cytokines in sarcoidosis. *Semin Resp Infect* 1998;13:184-196.
16. David R Moller, Forman JD, Liu MC, Noble PW, Greenlee BM, Vyas P, et al. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996;156:4952-4960.
17. Stephen W Chensue, Warmington K, Ruth J, Lincoln P, Kuo M-C, Kunkel SL. Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 1994;145:1105-1113.
18. Ian M Orme, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascade in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* 1999 Jul;20(7):307-312.
19. Vestbo J, Viskum K. Respiratory symptoms at presentation and long-term vital prognosis in patients with pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1994;11:123-125.
20. Miura K, Takahashi K, Fukushi Y. Role of biochemical markers in Sarcoidosis (Abstract). *Nippon Rinsho* 2002;60(9):1741-1746.
21. Grosso M, Margollicci MA, Bargagli E, Buccoliero QR, Perrone A, Galimberti D, Morgese G, Balestri P, Rottoli P. Serum levels of chitotriosidase as a marker of disease activity clinical stage in sarcoidosis. *Scand J Lab Invest* 2004;64(1):57-62.
22. Guy M Tremblay, Wolbink AM, Cormier Y, Hack

- CE. Granzyme activity in the inflamed lung is not controlled by endogenous serine proteinase inhibitors. *J Immunol* 2000;165:3966-3969.
23. Barbara J Johnson, Costelloe EO, Fitzpatrick DR, Haanen JBAG, Schumacher TNM, Brown LE, Kelso A. Single-cell perforin and granzyme expression reveals the anatomical localization of effector CD8⁺ T cells in influenza virus-infected mice. *PNAS* 2002;100(5):2657-2662.
24. Julián Pardo, Balkow S, Anel A, Simon MM. The differential contribution of granzyme A and granzyme B in cytotoxic T lymphocyte-mediated apoptosis is determined by the quality of target cells. *Eur J Immunol* 2002;32:1980-1985.
25. Masson D, Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* 1987;49:679-685.
26. Mark J Smyth, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 1995;16(4):202-206.
27. Satoru Hashimoto, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Nakajima H. Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. *Am J Resp Crit Care Med* 2000;161:237-243.
28. Christof Wagner, Iking-Konert C, Deneffle B, Stegmaier S, Hug F, Hänsch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 2004;103(3):1099-1104.
29. Kathrin Hohegger, Eller P, Rosenkranz AR. Granzyme A: an additional weapon of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs). *Blood* 2004;103(3):1176.
30. Ruili Shi, Yang J, Jaramillo A, Steward NS, Aloush A, Trulock EP, Patterson GA, Suthanthiran M, Mohanakumar T. Correlation between interleukin-15 and granzyme B expression and acute lung allograft rejection. *Transplant Immunol* 2004;12:103-108.
31. Shresta S, Heusel JW, Macivor DM, Wesselschmidt RL, Russel JH, Ley TJ. Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. *Immunol Rev* 1995;146:211.
32. Baogui Li, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Rasmawamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001;344(13):947-954.
33. Jürgen Strehlau, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(2):695-700.
34. Judy Lieberman, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 2003;15:553-559.
35. MM Simon, Kramer MD, Prester M, Gay S. Mouse T-cell associated serine proteinase 1 degrades collagen type IV: a structural basis for migration of lymphocytes through vascular basement membranes. *Immunology* 1991;73:117-119.
36. Martin Irmeler, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R, Tschopp J. Granzyme A is an interleukin 1 β -converting enzyme. *J Exp Med* 1995;181:1917-1922.
37. Laurie E Sower, Froelich CJ, Allegretto N, Rose PM, Hanna WD, Klimpel GR. Extracellular activities of human granzyme A. Monocyte activation by granzyme A versus a-trombin. *J Immunol* 1996;156:2585-2590.
38. Laurie E Sower, Klimpel GR, Hanna W, Froelich CJ. Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines. *Cell Immunol* 1996;171:159-163.
39. Hana S Suidan, Clemetson KJ, Brown-Luedi M, Niclou SP, Clemetson JM, Tschopp J, Monard D. The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin. *Biochem J* 1996;315:939-945.
40. Christopher J Froelich, Zhang X, Turbov J, Hudig D, Winkler U, Hanna WL. Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. *J Immunol* 1993;151(12):7161-7171.
41. MM Simon, Simon HG, Fruth U, Epplen J, Müller-Hermelink HK, Kramer MD. Cloned cytolytic T-effector cells and their malignant variants produce an extracellular matrix degrading trypsin-like serine proteinase. *Immunology* 1987;60:219-230.
42. Elisabeth HA Spaeny-Dekking, Hanna WL, Wolbink AM, Wever PC, Kummer AJ, Swaak AJG, et al. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 1998;160:3610-3616.
43. Kai Bratke, Böttcher B, Leeder K, Schmidt S, Küpper M, Virchow JC, Luttmann W. Increase in granzyme B⁺ lymphocytes and soluble granzyme bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma.

Clin Exp Immunol 2004;136(3):542-548.

44. Snjezana Rothkrantz-Kos, van Dieijen-Visser MP, Mulder PGH, Drent M. Potential usefulness of inflammatory markers to monitor respiratory functional impairment in sarcoidosis. Clin Chem 2003 Sep;49(9):1510-1517.

45. Cyrille Bergoin, Lamblin C, Wallaert B. Biological manifestations of sarcoidosis (Manifestations biologiques au cours de la sarcoïdose). Ann Med Interne (Paris) 2001;152(1):34-38.

46. Baudin B. New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. Clin Chem Lab Med 2002;40(3):256-265.

47. Costabel U, Teschler H. Biochemical changes in sarcoidosis. Clin Chest Med 1997;18(4):827-842.

48. Beneteau-Burnat B, Baudin B. Angiotensin-converting enzyme: clinical applications and laboratory investigations on serum and other biological fluids. Crit Rev Clin Lab Sci 1991;28(5-6):337-356.

49. Lauta VM. ACE: physiopathology and role in the diagnosis and prognosis of systemic granulomatosis, neoplasms and lung toxicity caused by antineoplastic agents. Recenti Prog Med 1990;81(9):601-613.

50. ACTM Peeters, Netea MG, Kulberg BJ, Thien T, Van der Meer JWM. The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro- and anti-inflammatory cytokine production. Immunology 1998;94:376-379.

51. Manfred Schurmann. Angiotensin-converting en-

zyme gene polymorphisms in patients with pulmonary sarcoidosis: impact on disease severity. Am J Pharmacogenomics 2003;3(4):233-243.

52. S Reitamo, Klockars M, Adinolfi M, Osserman EF. Human lysozyme (origin and distribution in health and disease). Ric Clin Lab 1978;8(4):211-231.

53. Joseph A Trapani. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. Genome Biol 2001;2(12):Reviews3014.1-3014.7.

54. Robert V Talanian, Yang XH, Turbov J, Seth P, Ghayur T, Casiano CA, Orth K, Froelich CJ. Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. J Exp Med 1997;186(8):1323-1331.

55. Dong Zhang, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(10):5746-51.

56. IJM ten Berge, Wever PC, Wolbink AM, Surachno J, Wertheim PME, Spaeny LHA, Hack CE. Increased systemic levels of soluble granzymes A and B during primary cytomegalovirus infection after renal transplantation. Transplant Proc 1998;30:3972-3974.

57. Tak PP, Spaeny-Dekking L, Kraan MC, Breedveld FC, Froelich CJ, Hack CE. The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). Clin Exp Immunol 1999; 116:366.