

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Leonardo Rodrigues de Oliveira

Imunoexpressão de granzima B em linfócitos citotóxicos de linfonodos de pacientes com
linfomas B agressivos e correlação de variáveis de prognóstico

Uberaba

2018

Leonardo Rodrigues de Oliveira

Imunoexpressão de granzima B em linfócitos citotóxicos de linfonodos de pacientes com linfomas B agressivos e correlação de variáveis de prognóstico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes-Souza

Uberaba

2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

O48i Oliveira, Leonardo Rodrigues de
Imunoexpressão de granzima B em linfócitos citotóxicos de linfonodos de
pacientes com linfomas B agressivos e correlação de variáveis de prognóstico
/ Leonardo Rodrigues de Oliveira. – 2018.
65 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Carlos de Oliveira Meneses, Profa. Dra.
Fernanda Bernadelli De Vito

1. Linfoma de Hodgkin. 2. Linfoma difuso de grandes células B. 3. Imu-
no-Histoquímica. 4. Granzimas. 5. Prognóstico. I. Souza, Helio Moraes de. II.
Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616-006.44

Leonardo Rodrigues de Oliveira

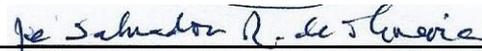
Imunoexpressão de granzima B em linfócitos citotóxicos de linfonodos de pacientes com
linfomas B agressivos e correlação de variáveis de prognóstico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, área de
concentração Patologia Humana, da
Universidade Federal do Triângulo Mineiro,
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes-Souza

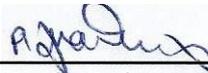
Uberaba, 28 de agosto de 2018

Banca Examinadora:



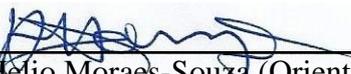
Prof. Dr. José Salvador Rodrigues de Oliveira

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP



Prof. Dr. Paulo Roberto Juliano Martins

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM



Prof. Dr. Helio Moraes-Souza (Orientador)

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Este trabalho é dedicado a Deus, a meus pais,
a minha esposa e a todos que tomaram e
tomam parte em minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meus pais, Marco e Ana Patrícia, e minha esposa, Luciana, pelo incondicional apoio.

Agradeço pela assistência de meu orientador, Prof. Dr. Helio Moraes de Souza, e meus co-orientadores, Dr. Antônio Carlos de Oliveira Meneses e biomédicas Fernanda Bernadelli De Vito e Bruna Maria Bereta de Sousa, assim como, colegas que comigo ombrearam a trajetória até aqui percorrida.

Agradeço aos funcionários da área técnica do Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo auxílio nos trabalhos de imuno-histoquímica, em especial Cláudio Lúcio dos Santos e Luzia Helena Gonçalves dos Santos.

RESUMO

Introdução: Os linfócitos citotóxicos (linfócitos T CD8+ e células *natural-killer*) são capazes de induzir a apoptose de células infectadas por vírus e células transformadas através da secreção de grânulos citotóxicos ricos em granzima B. Dados sobre a infiltração destas células em amostras de linfomas B agressivos são controversos e sua relação com dados pré-tratamento, utilizados para fins de estadiamento, é pouco conhecida. *Objetivos:* Avaliar a expressão de granzima B em linfócitos no microambiente tumoral de linfoma Hodgkin clássico e de linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B e correlacionar estas informações com variáveis clínicas e de prognóstico, e resposta ao tratamento inicial. *Métodos:* Amostras de linfonodos comprometidos por linfoma Hodgkin ou linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B foram analisadas por técnica de imuno-histoquímica quanto à expressão de granzima B. Os resultados foram comparados com idade, gênero, estadiamento tumoral de Ann Arbor, presença de sintomas B, expressão de CD8, infiltração de medula óssea por linfoma, concentração sérica de desidrogenase láctica, concentração sérica de β 2-microglobulina e resposta ao tratamento inicial. *Resultados:* A expressão de granzima B foi menor em amostras de pacientes com estadiamento tumoral avançado ($p=0,025$) e naqueles com medula óssea infiltrada por linfoma ($p<0,0001$). Houve correlação inversa entre a expressão de granzima B e níveis séricos de β 2-microglobulina ($p=0,0375$; $r=-0,4270$). *Conclusão:* A análise da expressão de granzima B em linfonodos comprometidos por linfomas B agressivos pode constituir ferramenta útil na aferição do prognóstico destes cânceres.

Palavras-chave: Granzimas. Imuno-Histoquímica. Linfoma Difuso de Grandes Células B. Linfoma de Hodgkin. Prognóstico.

ABSTRACT

Background: Cytotoxic lymphocytes (CD8+ T lymphocytes and natural killer cells) are able to induce apoptosis of virus-infected and transformed cells through the secretion of cytotoxic granules rich in granzyme B. Data on the infiltration of these cells into the tumor tissue of aggressive B lymphomas are controversial, and the relationship with pre-treatment data, used for staging purposes, is poorly understood. Thus, this study is aimed at evaluating the expression of granzyme B in lymphocytes in the classic Hodgkin's lymphoma tumor and diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma and correlating this expression with clinical and prognostic variables as well as with the response to initial treatment. *Methods:* Samples of lymph nodes compromised by Hodgkin's lymphoma or diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma were analyzed by immunohistochemistry for granzyme B expression. Results were compared with respect to age, sex, Ann Arbor tumor staging, the presence of B-symptoms, CD8 expression, bone marrow infiltration by lymphoma, serum lactic dehydrogenase, serum β 2-microglobulin, and response to initial treatment. *Results:* Granzyme B expression was lower in samples from patients with advanced tumor staging ($p=0.025$) and in those with bone marrow infiltrated by lymphoma ($p<0.0001$). An inverse correlation between granzyme B expression and serum β 2-microglobulin levels ($p=0.0375$; $r=-0.4270$) was observed. *Conclusion:* Analysis of granzyme B expression in lymph nodes compromised by aggressive B lymphomas may be a useful prognosis tool for these cancers.

Keywords: Granzyme B. Immunohistochemistry. Diffuse Large Cell Lymphoma. Hodgkin, Lymphoma. Prognosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sinapse imunológica entre célula alvo e célula efetora.....	20
Figura 2 – Mecanismos de internalização para indução de apoptose deflagrada por granzima B.....	21
Figura 3 – Mecanismos moleculares de indução de morte celular pela atuação sinérgica de perforina e granzimas.....	22
Figura 4 – Análise histopatológica de linfonodo comprometido por linfoma Hodgkin.....	24
Figura 5 – Análise histopatológica de linfonodo comprometido por linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B.....	26
Figura 6 – Controles de reações de imuno-histoquímica para CD8, CD56 e granzima B em amostras de baço normal.....	35
Figura 7 – Expressão imuno-histoquímica de CD8 em amostras de linfomas.....	36
Figura 8 – Expressão imuno-histoquímica de CD56 em amostras de linfomas.....	36
Figura 9 – Expressão imuno-histoquímica de granzima B em amostras de linfomas.....	36
Figura 10 – Estudo da expressão de granzima B em relação ao tipo de linfoma B e presença de infecção pelo HIV.....	38
Figura 11 – Expressão de granzima B em relação à idade, gênero e localização de linfonodo.....	39
Figura 12 – Correlação entre a expressão de granzima B e β 2Mr.....	39
Figura 13 – Expressão de granzima B em relação ao estadiamento de Ann Arbor e a infiltração de medula óssea por linfoma.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Clones, isotipos, diluições, tampões para recuperação antigênica e fabricantes dos anticorpos primários usados no estudo por imuno-histoquímica.....	30
Tabela 2 – Características dos pacientes com LH e LNHDGCB quanto às variáveis clínicas e laboratoriais.....	33
Tabela 3 – Tratamento antineoplásico inicial dos pacientes estudados.....	34
Tabela 4 – Desfecho do tratamento inicial.....	35
Tabela 5 – Análise da expressão de granzima B em relação às variáveis clínicas e laboratoriais.....	37

LISTA DE SIGLAS

ABVD - doxorrubicina, bleomicina, vimblastina, dacarbazina

ACOM - Antônio Carlos de Oliveira Meneses

APC - *antigen-presenting cell* (célula apresentadora de antígenos)

BEACOPP - bleomicina, etoposide, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona, prednisona

BID - *BH3-interacting domain death agonist*

CA - Califórnia

Ca²⁺ - íons cálcio

CCL11 - *C-C motif chemokine 11*

CCL17 - *chemokine (C-C motif) ligand 17*

CCL22 - *C-C motif chemokine 22*

CCL5 - *chemokine (C-C motif) ligand 5*

CD - *cluster of differentiation* (cluster de diferenciação)

CD94/NKG2A - receptor CD94/NKG2A

CHOP - ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona

CTLA-4 - *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos)

DHL - desidrogenase láctica

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

EBV - vírus Epstein-Barr

Fas-FasL - via Fas-FasL

FasL - ligante do Fas

FOXP3 - *forkhead box protein P3*

GzB - granzima B

HC-UFTM - Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

HE - hematoxilina & eosina

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (vírus da imunodeficiência humana)

HLA-DR - *human leukocyte antigen DR type* (antígeno leucocitário humano tipo DR)

IgG - imunoglobulina G

IHQ - imuno-histoquímica

IL-10 - interleucina 10

IL-12 - interleucina 12

IL-13 - interleucina 13

IL-15 - interleucina 15

IL-2 - interleucina 2

IL-4 - interleucina 4

INCA - Instituto Nacional do Câncer

INF- γ - interferon-gama

Kb - quilobases

KIR - *killer immunoglobulin-like receptor*

LH - linfoma Hodgkin

LNH - linfoma não-Hodgkin

LNHDGCB - linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B

LRO - Leonardo Rodrigues de Oliveira

LSN - limite superior de normalidade

LTC - linfócitos T citotóxicos

MALT - *mucosa-associated lymphoid tissue* (tecido linfoide associado à mucosa)

MHC-I - *major histocompatibility complex class I* (complexo de histocompatibilidade principal classe I)

mm - milímetros

mm² - milímetros quadrado

mm³ - milímetros cúbico

MOMP - *mitochondrial outer membrane permeabilization* (permeabilização da membrana externa mitocondrial)

MPR - *mannose 6-phosphate receptor* (receptor manose-6-fosfato)

MRT - morte relacionada a tratamento

MTOC - *microtubule-organizing center* (centro de organização de microtúbulos)

NCR - *natural cytotoxicity receptor* (receptor citotóxico natural)

NK - *natural killer*

NKG2D - receptor *natural-killer* grupo 2, membro D

NR - não realizado

PD-1 - *programmed death 1 protein* (proteína de morte celular programada 1)

PD-L1 - *programmed death-ligand 1* (ligante 1 de morte celular programada)

PD-L2 - *programmed death-ligand 2* (ligante 2 de morte celular programada)

pH - potencial hidrogeniônico

PI3K - *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase)

PI-9 - *proteinase inhibitor 9* (inibidor 9 de protease)

PRF1 - gene da perforina

ROCK II - *Rho-associated coiled coil-containing protein kinase 2*

SG - serglicina

SMAC - *second mitochondria-derived activator of caspase*

STX11 - gene *STX11*

STXBP2 - gene *STXBP2*

tBID - BID truncado

TCR - *T-cell receptor* (receptor de célula T)

TGF- β - *transforming growth factor β* (fator de crescimento transformante β)

TIA-1 - *T-cell intracytoplasmic antigen* (antígeno intracitoplasmático de célula T)

TNF- α - *tumor necrosis factor α* (fator de necrose tumoral α)

TRAIL - *tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand* (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral)

Treg - linfócito T regulador

Tris/EDTA - *tris(hydroxymethyl)aminomethane-ethylenediaminetetraacetic acid* (solução tampão de ácido etilendiamino tetra-acético)

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UNC13D - gene *UNC13D*

vs. - *versus*

ZAP - *zeta-associated protein 70* (proteína quinase associada à cadeia zeta 70 kDa)

β 2M - beta-2-microglobulina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	DESENVOLVIMENTO.....	16
2.1.	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1.1.	Epidemiologia dos linfomas no Brasil e no mundo.....	15
2.1.2.	Controle imunológico do câncer.....	15
2.1.3.	A via perforina-granzimas.....	17
2.1.4.	Células tumorais e células imunes no microambiente tumoral.....	23
2.1.5.	Mecanismos de evasão tumoral de linfomas B agressivos.....	25
2.2.	OBJETIVOS.....	28
2.2.1.	Objetivos específicos.....	28
2.3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.3.1.	Pacientes.....	29
2.3.2.	Dados clínicos e laboratoriais.....	29
2.3.3.	Técnica de imuno-histoquímica.....	30
2.3.4.	Análise imuno-histoquímica.....	31
2.3.5.	Análise estatística.....	31
2.4.	RESULTADOS.....	33
2.5.	DISCUSSÃO.....	42
3.	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXO A – Fluxograma com dados de inclusão e exclusão de pacientes.....	61
	ANEXO B – Técnica de Imuno-Histoquímica.....	62
	ANEXO C – Atestado de Aprovação.....	65

1. INTRODUÇÃO

Os linfócitos citotóxicos compreendem linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (LTC) e células *natural-killer* (células NK). A morte celular orquestrada por estas células representa mecanismo eficiente e rápido para a eliminação de células infectadas e transformadas, sendo a exocitose de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas, a principal via utilizada para este fim.

Tendo havido o reconhecimento da célula alvo, as granzimas são liberadas por células imunes citotóxicas na sinapse imunológica formada entre a célula alvo e a célula imune para, em seguida, serem internalizadas na célula alvo para o desfecho final, a apoptose por meio da ativação de vias dependentes e independentes das caspases (TRAPANI, 2012; ROUSALOVA; KREPELA, 2010). A granzima B (GzB) é a mais efetiva das granzimas e apresenta atividade pró-apoptótica semelhante à das caspases pela clivagem de proteínas da célula alvo em resíduos de aspartato (CULLEN; MARTIN, 2008; SUTTON et al, 2000; SUTTON et al, 2003). Até o momento, não são conhecidas doenças em seres humanos decorrentes da deficiência de granzimas, assim como, não está devidamente esclarecido se condições de deficiência exclusiva de granzimas implicam em maior ocorrência de câncer como resultado do potencial prejuízo da função tumoricida desempenhada por células imunes efectoras (TRAPANI; SMYTH, 2002; CULLEN; BRUNET; MARTIN, 2010).

No microambiente tumoral de linfomas, a complexa interação entre células tumorais e células imunes revela-se na presença de distintas populações celulares não neoplásicas que infiltram o leito tumoral. Para a instalação e a progressão do linfoma, as células malignas dispõem de complexos artifícios para o escape da atividade de células imunes e, assim, são capazes de induzir a falha do exercício da função de imunovigilância. Adicionalmente sabe-se que o grau de infiltração de células imunes citotóxicas no microambiente tumoral não guarda necessariamente relação com a intensidade e a qualidade da resposta imune, visto que as células imunes podem ser induzidas a estado disfuncional (LADÁNYI, 2004).

O significado prognóstico da expressão de GzB em linfonodos de pacientes com linfomas são conflitantes (MURIS et al, 2004; OUDEJANS et al, 1997; KELLEY et al, 2007; CHANG et al, 2007). Além do mais, os escores de prognóstico em linfomas agressivos apresentam limitações, principalmente na identificação de pacientes considerados no início do

tratamento como de bom prognóstico, mas com evolução contrariamente marcada por desfechos desfavoráveis. Assim, informações adicionais acerca da densidade e da efetiva função de células imunes do microambiente tumoral, sejam elas obtidas por dados teciduais adquiridos por técnica de imuno-histoquímica (IHQ), sejam elas obtidas por ensaios funcionais, podem auxiliar no refinamento dos preditores de prognóstico nestes cânceres. Além disto, o conhecimento da intensidade da expressão de GzB em linfomas B pode criar condições para o melhor entendimento da complexa rede de eventos envolvidos na linfomogênese e sua relação com as variáveis clássicas de prognóstico.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1. Epidemiologia dos linfomas no Brasil e no mundo

Os linfomas compõem grupo heterogêneo de malignidades linfoides com incidência variável entre as diferentes regiões do planeta. O linfoma não-Hodgkin (LNH) é a malignidade hematológica mais comum e corresponde a aproximadamente 5,1% entre todos os cânceres, respondendo por 2,7% de todas as mortes por câncer (BOFFETTA, 2011). O linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B (LNHDGCB) é o subtipo mais comum dentre os LNH e corresponde a 30-40% de todos os linfomas nas diferentes regiões do mundo (LI S; YOUNG KH; MEDEIROS LJ, 2018). Dados do Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA) preveem 5370 casos novos de LNH em homens e 4810 em mulheres por ano no Brasil, durante o biênio 2018-2019 (BRASIL, 2018). Já o linfoma Hodgkin (LH) corresponde a subtipo incomum e agressivo de linfoma de células B com incidência bimodal, maior entre adultos jovens e em pacientes com mais de 55 anos (ANSELL, 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). Para o biênio 2018-2019 no Brasil, são esperados anualmente 1480 e 1050 casos novos de LH em homens e em mulheres, respectivamente (BRASIL, 2018).

2.1.2. Controle imunológico do câncer

O meio intracelular não é diretamente acessível ao monitoramento pelo sistema imunológico sendo por isto necessário que vias de sinalização permitam o reconhecimento do fim do ciclo de vida celular ou defeitos decorrentes de infecções ou de transformação maligna (CULLEN; MARTIN, 2008; KÄGI et al, 1996).

As células efetoras citotóxicas compreendem os LTC e células NK. Os LTC são células antígeno-específicas, especializadas na eliminação de células alvo de maneira dependente de contato a partir do reconhecimento de antígenos específicos, estes últimos processados e expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos (APC) por moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I (MHC-I) (SHRESTA et al, 1998; VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015). As células NK não requerem pré-ativação por APC e podem eliminar células infectadas ou células transformadas de

maneira rápida e efetiva através da secreção de citocinas com efeitos imunoestimulatórios e atividade antimicrobiana (interferon-gama [IFN- γ] e fator de necrose tumoral-alfa [TNF- α]), não requerendo o reconhecimento de antígenos expressos por moléculas do MHC-I (COLUCCI; CALIGIURI; Di SANTO, 2003; TRINCHIERI, 1989; KÄGI et al, 1996, CHRETIEN et al, 2014).

Para a morte celular orquestrada por estas células imunes citotóxicas, duas são as vias principais empregadas: a via mediada por exocitose de grânulos citotóxicos (via perforina-granzimas) e a via de ligação a receptores de morte celular (via Fas-FasL e via TRAIL) (CULLEN; MARTIN, 2008; TRAPANI; SMYTH, 2002). O mecanismo principal pelo qual a morte celular ocorre pela via de exocitose de grânulos se processa pela indução de apoptose e objetiva o controle de células infectadas por patógenos intracelulares, células de alo-enxertos e células tumorais (CULLEN; BRUNET; MARTIN, 2010). Estes grânulos são ricos em substâncias tóxicas como perforina, granzimas e granulicina (VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015). Assim, a apoptose representa mecanismo para a eliminação de células não desejadas em organismos multicelulares e constitui a principal forma de morte celular que ocorre durante o desenvolvimento, o remodelamento tecidual, a homeostase celular e a resposta imunológica.

2.1.3. A via perforina-granzimas

Compondo a via perforina-granzimas, as granzimas atuam em conjunto com a perforina e este sinergismo foi primeiramente descrito por Jurg Tschopp (TRAPANI, 2012). Nesta associação, a principal função da perforina seria mediar a internalização de granzimas, em especial GzB, permitindo a esta última a indução de apoptose da célula alvo por mecanismos diversos.

As granzimas são proteínas componentes da família de serino-proteases, armazenadas no interior de grânulos citoplasmáticos de LTC e de células NK e secretadas por exocitose para a eliminação de células alvo (TRAPANI, 2012; GROSSMAN et al, 2003). A partir de técnicas de gradiente de densidade Percoll, o isolamento de grânulos do citoplasma de células NK permitiu a obtenção de mistura rica em serino-proteases denominadas granzimas (em referência a *Granules associated Enzymes*) (TRAPANI, 2012). O termo granzimas foi

primeiramente empregado por Danièle Masson e colaboradores em 1986 (MASSON et al, 1986).

O gene da GzB humana está localizado no locus *chymase* no cromossomo 14q12 com comprimento de aproximadamente 3,3 *kb* e composto por cinco *exons* e quatro *introns* com a pré-proteína da GzB codificada pelo *exon* I (KLEIN et al, 1989; HADDAD et al, 1990). Três são os genes funcionais sendo eles o gene granzima H, gene da catepsina G e o gene *chymase* de mastócitos (HEUSEL et al, 1991). Estudo conduzido por Garcia-Sanz e colaboradores demonstrou a indução da expressão do gene da granzima e atividade de protease após ativação de linfócitos mediada por interleucina 2 (IL-2) (GARCIA-SANZ et al, 1988). Maior expressão de granzima ocorreu em 3-4 dias após o estímulo inicial com marcada redução após este período, persistindo a proliferação de linfócitos T nos dias subsequentes (GARCIA-SANZ et al, 1988). A expressão gênica é regulada em nível transcricional e traducional e é estimulada por fatores que controlam a atividade imunológica (BOIVIN et al, 2009). A ativação transcricional em linfócitos T envolve a ativação de linfócitos T e co-estimulação por citocinas (CHOWDHURY; LIEBERMAN, 2008). A regulação pós-traducional é marcada por eventos vários que incluem a síntese de GzB como pró-peptídeo, a clivagem proteolítica para ativação e marcação da GzB com o receptor manose-6-fosfato (MPR), este último com a função de direcionar a protease para composição de grânulos líticos ácidos (GRIFFITHS; ISAAZ, 1993).

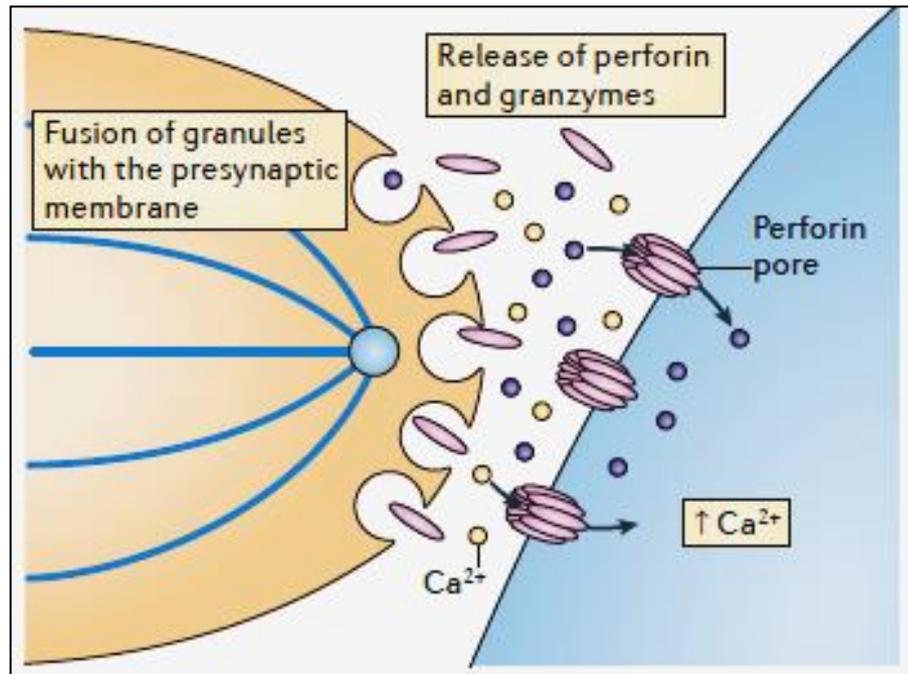
Cinco são os tipos de granzimas humanas (A, B, H, K e M) (GROSSMAN et al, 2003; FAN Z; ZHANG Q, 2005). No citoplasma da célula efetora, as granzimas são estocadas no interior de lisossomos (pH 5,1-5,4) em associação com sulfato de condroitina para posterior secreção em complexo macromolecular com proteoglicano serglicina (GALVIN et al, 1999; METKAR et al, 2002; RAJA et al, 2002; GRUJIC et al, 2005; CHOWDHURY; LIEBERMAN, 2008). A GzB é a mais efetiva das granzimas e exibe atividade pró-apoptótica semelhante a das caspases, promovendo a clivagem de proteínas da célula alvo em resíduos de aspartato (CULLEN; MARTIN, 2008; SUTTON et al, 2000; SUTTON et al, 2003).

Com a expressão restrita a linfócitos citotóxicos, as células NK humanas expressam perforina e granzimas A e B de maneira constitutiva enquanto que os LTC as expressam apenas após ativação mediada por reconhecimento antigênico (FEHNIGER et al, 2007; GRAUBERT; LEY, 1996). A GzB pode ser expressa em outras células de origem hematopoética (linfócitos T CD4+, mastócitos, macrófagos ativados, células de Küpffer,

neutrófilos, basófilos, células dendríticas) e, em condições pró-inflamatórias, em células de origem não-hematopoética (células musculares lisas, condrócitos, queratinócitos, pneumatócitos tipo II, células de Sertoli, espermatozóitos primários e células da granulosa e do sincitiotrofoblasto) (BOIVIN et al, 2009; GARCIA-SANZ et al, 1988; BLEACKLEY, 2005). Em condições patológicas, a GzB foi detectada em células tumorais de cânceres de mama, cânceres de pulmão, carcinomas uroteliais, cânceres de boca e linfomas não-Hodgkin T/NK do tipo nasal (KONTANI et al, 2001; HU et al, 2003; D'ELISEO et al, 2010; KO et al, 2007; COSTA et al, 2010). Além disto, as granzimas têm sido encontradas na matriz de tecidos cronicamente inflamados e em líquidos corporais como o plasma durante a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e durante a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o plasma e o líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, o líquido de pacientes com esclerose múltipla e encefalite de Rasmussen e o lavado broncoalveolar de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e doenças inflamatórias pulmonares (BUZZA; BIRD, 2006; TAK et al, 1999; SPAENY-DEKKING et al, 1998; BRATKE et al, 2004; MALMESTRÖM et al, 2008; TAKAHASHI et al, 2009; TREMBLAY et al, 2000).

Evidências adicionais das granzimas A e B como as principais granzimas indutoras de morte celular são provenientes de estudos com camundongos granzima A/B *knockout* (PARDO et al, 2004). Havendo o reconhecimento da célula alvo a ser eliminada pelas células efetoras citotóxicas, há a expansão clonal destas células imunes e o aumento da produção de grânulos citotóxicos (SHRESTA et al, 1998). Grânulos citotóxicos abundantes em perforina e granzimas e organizados no interior de lisossomos são secretados a partir de transporte vetorial em direção a zona de conjugação. Após a fusão da membrana de lisossomos com a membrana plasmática da célula efetora, o conteúdo dos lisossomos é liberado em uma fenda microscópica intercelular chamada sinapse imunológica (MAHRUS; CRAIK, 2005; FAN; ZHANG, 2005). O processo de direcionamento de lisossomos com grânulos citotóxicos no citoplasma da célula efetora é dependente de cálcio (Ca^{2+}) e é feito por meio do remodelamento do citoesqueleto celular e outros eventos moleculares intracelulares, culminando com a formação do centro de organização de microtúbulos (MTOC) para a convergência de grânulos (PORES-FERNANDO; ZWEIFACH, 2009; DUSTIN; LONG, 2010; LAGRUE et al, 2013; GEIGER; ROSEN; BERKE, 1982; KUPFER; DENNERT, 1984; KUPFER; DENNERT; SINGER, 1985). As granzimas liberadas na sinapse imunológica podem eliminar células alvo adjacentes em série (“*serial killer*”) através do extravasamento a partir da sinapse imunológica (FIG. 1) (ISAAZ et al, 1995; PRAKASH; BIRD; BIRD, 2009).

Figura 1 – Sinapse imunológica entre célula alvo e célula efetora

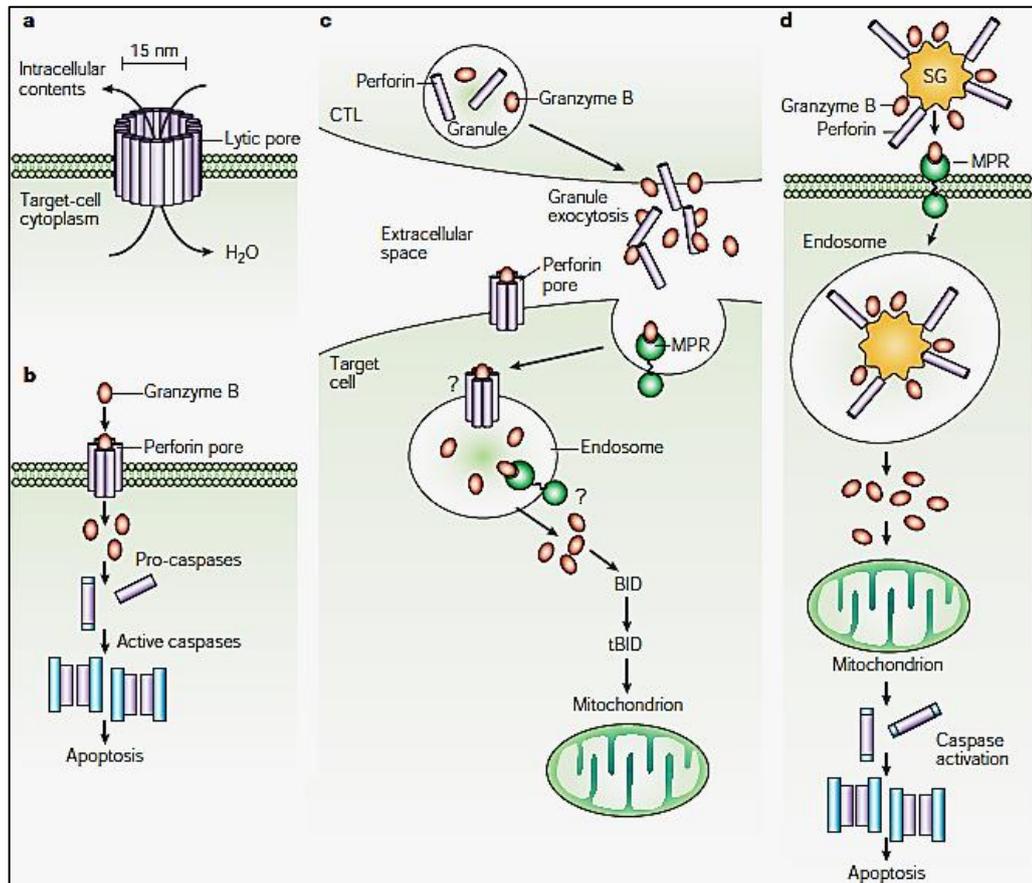


Interface de interação (sinapse imunológica) entre a célula alvo (à direita) e célula efetora (à esquerda) no citoplasma da qual os grânulos armazenadas são direcionados para a sinapse imunológica por meio da formação do centro de organização de microtúbulos (em azul). Ca^{2+} : íons cálcio.

Fonte: VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015.

As granzimas não são capazes de se ligar diretamente ou de promover o rompimento de membranas lipídicas de maneira independente. Os mecanismos de internalização de granzimas no citoplasma da célula alvo não estão por completo estabelecidos (BOIVIN et al, 2009; ROUSALOVA; KREPELA, 2010; CULLEN; MARTIN, 2008). Para a internalização, os mecanismos considerados incluem a difusão simples através de poros de perforina, captação endocítica com posterior permeabilização de endossomos mediada por perforina (endossomólise) ou pinocitose absorptiva independente de receptores (FIG. 2). (BIRD et al, 2005; RAJA et al, 2005; KURSCHUS et al, 2008; FROELICH et al, 1996; BROWNE et al, 1999; METKAR et al, 2002; THIERY et al, 2011; SHI et al, 2005; PINKOSKI et al, 1998; VEUGELERS et al, 2006).

Figura 2 – Mecanismos de internalização para indução de apoptose deflagrada por granzima B



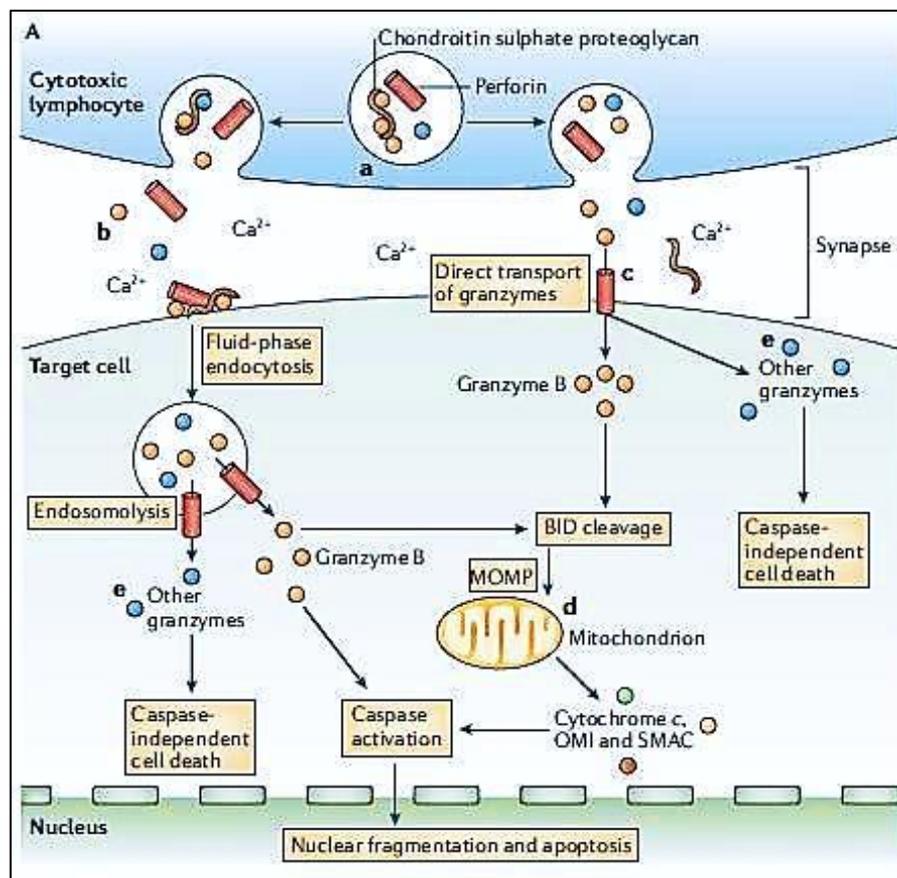
(a) papel da perforina que, quando polimerizada, é capaz de formar poros na membrana plasmática da célula alvo para consequente colapso hidrosmótico da célula alvo; (b) internalização de GzB através de poros formados por perforina na membrana plasmática da célula alvo; (c) internalização de GzB através de transportadores específicos, independente de perforina, sendo transportados para o citoplasma da célula-alvo através de endossomos com posterior liberação no citoplasma da célula alvo por meio de transportadores específicos e escape mediado por perforina (endossomólise); (d) internalização de GzB secretada em complexos macromoleculares pela ligação ao receptor manose-6-fosfato. CTL, linfócito citotóxico T; MPR, receptor manose-6-fosfato; BID, *BH3-interacting domain death agonist*; tBID, BID truncado; SG, serglicina.

Fonte: TRAPANI; SMYTH, 2002.

No citoplasma celular, as granzimas livres promovem a ativação proteolítica direta de pró-caspases executoras, clivagem de múltiplas proteínas *housekeeping* intracelulares (α -tubulina, filamina, β -fodrina e ROCK II), a permeabilização da lâmina nuclear pela clivagem de lamina B (permitindo o acesso de granzimas para clivagem de substratos proteicos intranucleares e ativação direta do fator de fragmentação do ácido desoxirribonucleico [DNA]) e destacamento de células da matriz extracelular (*anoikis*) através da clivagem de componentes desta matriz (fibronectina, vitronectina e laminina) (THORNBERRY et al, 1997; HARRIS et al, 1998; WATERHOUSE; SEDELIES; TRAPANI, 2006; BROWNE et al, 2000; KUWANA et al, 2001; SEBBAGH et al, 2005; ADRAIN; MURPHY; MARTIN, 2005;

ZHANG et al, 2001; TRAPANI et al, 1996; BALAJI et al, 2002; SHI et al, 1992; TRAPANI; SUTTON, 2003). As granzimas atuam ainda diretamente em mitocôndrias através da promoção da permeabilização da membrana e da indução de perda do potencial transmembrana (FIG. 3) (LUO, 1998; LI et al, 1998; KUWANA et al, 2002; JIANG; WANG, 2000; SLEE; ADRAIN; MARTIN, 1999; HILL et al, 2004; MacDONALD et al, 1999; ALIMONTI et al, 2001). O desfecho final da atividade em múltiplas vias das granzimas no interior da célula alvo é a apoptose pela ativação de vias dependentes e independentes das caspases (ROUSALOVA; KREPELA, 2010; TRAPANI, 2012).

Figura 3 – Mecanismos moleculares de indução de morte celular pela atuação sinérgica de perforina e granzimas



Ca^{2+} : íons cálcio; BID: *BH3-interacting domain death agonist*; MOMP: permeabilização da membrana externa mitocondrial; SMAC: *second mitochondria-derived activator of caspase*.

Fonte: VOSKOBOINIK; SMYTH; TRAPANI, 2006 (adaptado).

As granzimas podem ainda atuar por mecanismo independente de perforina através da indução de produção ou liberação de citocinas pró-inflamatórias por APC e através da

interferência em vias biossintéticas do metabolismo de vírus (TRAPANI, 2012; HIEBERT; GRANVILLE, 2012; ANDRADE et al, 2007; METKAR et al, 2008). A serpina inibidor 9 de protease (PI-9 ou serpina B9) é a única molécula endógena conhecida com propriedades inibitórias sobre a GzB (BIRD et al, 1998).

A comprovação da fundamental e peculiar função da perforina na citotoxicidade mediada por contato adveio apenas após trabalhos que demonstraram que camundongos *perforin-null* eram intensamente imunossuprimidos e ineficientes para induzir a morte de células alvo, não possuíam atividade citotóxica mediada por células NK e eram susceptíveis a infecções virais como a ectromelia e a infecção pelo vírus da coriomeningite linfocítica (MÜLLBACHER et al, 1996; KÄGI et al, 1994; TRAPANI, 2012). A redução da expressão de perforina pelo emprego de oligonucleotídeos *antisense* para indução de estado de *knockdown* parcial do gene da perforina resultou em redução proporcional da atividade indutora de morte celular (ACHA-ORBEA et al, 1990). Já para as granzimas, a capital colaboração para mecanismos de morte celular foi delineada a partir da evidência de ausência de ativação das vias de apoptose quando da expressão isolada e aumentada de perforina em condições de deficiência de granzimas (SHIVER; HENKART, 1991; SHIVER; SU; HENKART, 1992; NAKAJIMA; PARK; HENKART, 1995).

Recentemente, foi descrito alelo triplamente mutado da GzB com atividade proteolítica preservada e atividade apoptótica reduzida, permitindo melhor entendimento sobre a função da GzB (McILROY et al, 2003). Ainda assim, não são conhecidas doenças em seres humanos determinadas exclusivamente por deficiência de granzimas (TRAPANI; SMYTH, 2002). Maior ocorrência de câncer em condições de deficiência de granzimas, decorrente de prejuízo da função tumoricida de células imunes efetoras, também não está claro (CULLEN; BRUNET; MARTIN, 2010; TRAPANI; SUTTON, 2003). Camundongos deficientes em GzB não apresentaram maior susceptibilidade a linfoma (CULLEN; MARTIN, 2008).

2.1.4. Células tumorais e células imunes no microambiente tumoral

No embate contínuo e permanente para a instalação, a sobrevivência e a progressão do linfoma, a interação entre células tumorais e células não tumorais que permeiam o tecido tumoral e que tomam parte na composição do microambiente tumoral, é complexa e fundamental para a iniciação e a progressão do câncer.

A complexidade desta interação entre células de linfomas e células imunes no microambiente tumoral revela-se na presença de distintas populações celulares não neoplásicas que infiltram o tumor, no possível controle de determinados tipos de linfomas quando da erradicação de agentes infecciosos de potencial oncogênico (por exemplo, *Helicobacter pylori* no linfoma MALT gástrico) e na ocorrência de linfomas em sítios extranodais com escassa população linfoide (HERREROS; SANCHEZ-AGUILERA; PIRIS, 2008). Os tipos celulares que habitualmente se relacionam com as células tumorais em linfomas são linfócitos T reguladores (linfócitos Treg), linfócitos T *helper*-folicular B, linfócitos T citotóxicos, macrófagos, células dendríticas (foliculares, plasmocitoides e *interdigitating*), células endoteliais, mastócitos e eosinófilos (HERREROS; SANCHEZ-AGUILERA; PIRIS, 2008; COUPLAND, 2011). A disposição das células imunes ao redor e infiltrando linfomas sugere que as células neoplásicas são reconhecidas pelo sistema imune (FIG. 4).

Figura 4 – Análise histopatológica de linfonodo comprometido por linfoma Hodgkin



As células de Reed-Sternberg (seta) e células de Hodgkin representam as células neoplásicas em meio a infiltrado inflamatório reacional e não neoplásico no linfoma Hodgkin. Coloração de Hematoxilina & Eosina (HE), aumento 1000x.

Fonte: Cortesia de Dr. Antônio Carlos de Oliveira Meneses (Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro), 2018.

Todavia, este reconhecimento não garante o desenvolvimento de uma reação imune eficiente e os mecanismos de evasão tumoral parecem ser determinantes para a instalação e a progressão do câncer. O significado prognóstico destas diferentes populações celulares que infiltram o tumor é controverso, pois diferentes funções com fins distintos podem ser

executadas por um determinado tipo de célula (KELLEY et al, 2007; CHANG et al, 2007; OUDEJANS et al, 1997; MURIS et al, 2004). A exuberante infiltração linfocítica observada durante a progressão tumoral favorece a percepção de que estas células imunes não são capazes de organizar resposta imune eficiente para controle do câncer. Conseqüentemente, o grau de infiltração não necessariamente se relaciona com intensidade da resposta imune, pois estas células seriam funcionalmente defeituosas, incompletamente ativadas ou anérgicas (LADÁNYI et al, 2004).

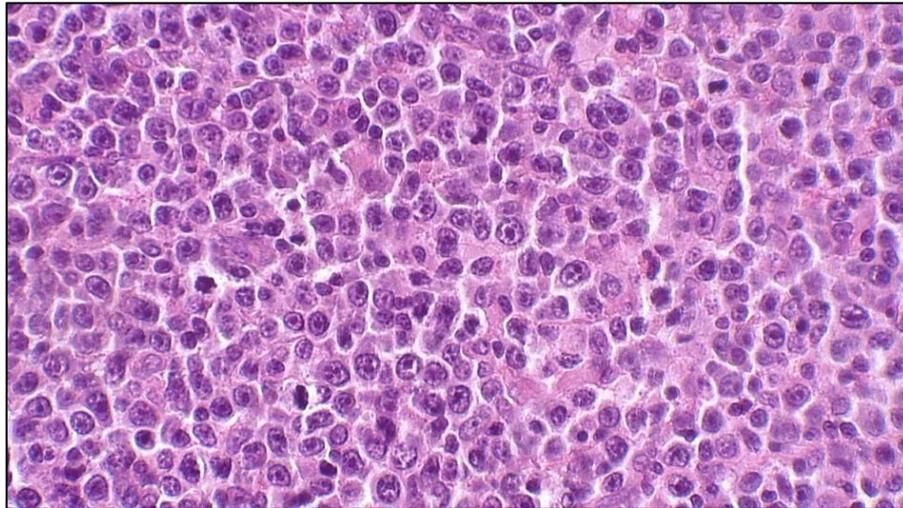
2.1.5. Mecanismos de evasão tumoral de linfomas B agressivos

Os mecanismos de evasão de células malignas no leito tumoral de LH são caracterizados pela falha do exercício da função imune de LTC que infiltram o leito tumoral. Dentre estes mecanismos estão incluídos a regulação negativa de moléculas MHC-I, a expressão de citocinas imunomoduladoras (interleucina 10 [IL-10], fator transformante de crescimento beta [TGF- β]) para a indução de anergia local de linfócitos T através da expressão do ligante 1 de morte celular programada (PD-L1) e do ligante 2 de morte celular programada (PD-L2), a expressão de proteínas neutralizadoras de perforina e granzimas, a indução de apoptose de LTC através da via FasL e a resistência intrínseca de células tumorais a apoptose (POPPEMA; VISSER, 1994; TAGA; TOSATO, 1992; MATSUDA et al, 1994; ROOK et al, 1986; LEE et al, 1998; BRINK et al, 1998; BECKER; CZERNY; BRÖCKER, 1994; YAMAMOTO et al, 2008). Especificamente para as granzimas, a resistência das células de Reed-Sternberg e células de Hodgkin à apoptose induzida por células citotóxicas poderia resultar da expressão pelas células tumorais de proteínas com capacidade de neutralizar a atividade de proteínas citotóxicas, como a PI-9 (SUN et al, 1996; BLADERGROEN et al, 2002; MEDEMA et al, 2001; ten BERGE et al, 1999).

O conhecimento acerca do microambiente tumoral do LNHDGCB é menos robusto e mais recente quando comparado a LH (FIG. 5). As células do LNHGGCB podem expressar antígenos linfoma-específicos junto a moléculas MHC e ativar resposta imune antitumor pelo reconhecimento destes antígenos por linfócitos T. A expressão tumoral de moléculas MHC-I em pacientes com LNHDGCB mantém relação direta com a sobrevida, sendo esta expressão menor em pacientes em recaída ou refratários em comparação a pacientes com doença controlada (JESIONEK-KUPNICKA et al, 2016; ZHOU et al, 2018). Assim, a não expressão destes antígenos linfoma-específicos pela perda da expressão de antígeno leucocitário humano tipo DR (HLA-DR) na superfície da célula tumoral poderia representar mecanismo de evasão

imune (RIEMERSMA et al, 2000; RIMSZA et al, 2004). Recentemente, mecanismo adicional de evasão imune através da indução de exaustão de células T efetoras pela regulação positiva de receptores inibitórios como a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) foi descrito (GREEN et al, 2010; CHEN et al, 2013). Chang e colaboradores descreveram que a expressão de mais de cinco linfócitos T GzB+ por campo de grande aumento (1000x) associou-se a melhor prognóstico após análise uni- e multivariada (CHANG et al, 2007). Outro estudo constatou efeito adverso sobre resposta completa, sobrevida livre de progressão e sobrevida global quando da presença de infiltração maior que 15% por LTC ativados (relação entre linfócitos GzB+ e linfócitos T CD3+) em pacientes com LNHDGCB (MURIS et al, 2004).

Figura 5 – Análise histopatológica de linfonodo comprometido por linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B



As grandes células neoplásicas constituem grande parte da população celular, estando estas permeadas por infiltrado inflamatório não neoplásico. Coloração de Hematoxilina & Eosina (HE), aumento 1000x.

Fonte: Cortesia de Dr. Antônio Carlos de Oliveira Meneses (Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro), 2018.

A técnica de IHQ com emprego de anticorpos anti-granzima B é capaz de detectar a imunoeexpressão de GzB no interior de lisossomos em linfócitos citotóxicos. Estudos para avaliação da expressão de proteínas citotóxicas em linfomas concentraram-se inicialmente em linfomas de células T devido à resistência intrínseca de células T ativadas aos mecanismos de apoptose deflagrados pela via perforina-granzima e consideração de que estes linfomas seriam a contrapartida maligna de células T e NK citotóxicas (MÜLLER; TSCHOPP, 1994; BLADERGROEN et al, 2002). Assim, o conhecimento da intensidade da expressão de GzB

em linfomas B pode propiciar meios para o melhor entendimento da complexa rede de eventos envolvidos na linfomogênese, assim como, melhor entendimento da relação desta expressão com as variáveis clássicas de prognóstico em linfomas.

2.2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão intratumoral de GzB em linfócitos presentes em linfonodos comprometidos por LH clássico ou LNHDGCB na ocasião do diagnóstico, e correlacionar esta expressão com variáveis clínicas e laboratoriais, bem como, com a resposta ao tratamento inicial.

2.2.1. Objetivos específicos

- a) Avaliar a expressão tecidual de GzB em linfonodos de pacientes com LH ou LNHDGCB;
- b) Correlacionar a expressão tecidual de GzB com idade, gênero, níveis de desidrogenase láctica (DHL) sérica, concentração sérica de β 2-microglobulina (β 2M), expressão tecidual de CD8, estadiamento de Ann Arbor, infiltração da medula óssea por linfoma e presença de sintomas B (febre, sudorese noturna ou perda ponderal superior a 10% do peso corporal decorrentes da presença de linfoma);
- c) Correlacionar a expressão tecidual de GzB com a resposta ao tratamento inicialmente proposto.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Pacientes

De uma coorte inicial de 114 pacientes, foram incluídas na análise amostras de biópsia de linfonodos de 32 pacientes, amostras estas provenientes dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM). Estas amostras eram provenientes de pacientes com diagnóstico inicial de LH clássico ou LNHDGCB, assistidos no Serviço de Oncologia, Radioterapia, Hematologia e Hemoterapia do HC-UFTM em Uberaba, entre 2008 e 2017. Não foram incluídos pacientes cujas amostras de linfonodos em blocos parafinizados estavam indisponíveis para análise ou em estado de conservação insatisfatório (sinais de autólise), assim como, pacientes com linfomas T ou NK ou outros tipos de linfomas B, pacientes em recaída de doença, pacientes com disponibilidade exclusiva de tecido extranodal para análise ou pacientes com prontuário médico indisponível ou com dados incompletos. Para todos os casos, foi realizada a revisão histopatológica segundo os critérios atuais da classificação de neoplasias linfoides da Organização Mundial da Saúde (SWERDLOW et al, 2017). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM através da Plataforma Brasil no parecer nº 2.254.655, sendo dispensada a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pela natureza retrospectiva do estudo e por as amostras em parafina estarem armazenadas e tuteladas pelo Serviço de Patologia Cirúrgica do HC-UFTM. Fluxograma com detalhamento de dados de inclusão e exclusão de pacientes em análise final é disposto em anexo A.

2.3.2. Dados clínicos e laboratoriais

Dados relativos ao momento do diagnóstico e anteriores ao início de qualquer modalidade de tratamento foram considerados para análise e a obtenção dos mesmos se fez através da revisão de prontuários médicos. Foram consideradas as seguintes características: idade, gênero, estadiamento de Ann Arbor, presença de sintomas B, concentração sérica de DHL, concentração sérica de $\beta 2M$ e presença de infiltração em medula óssea investigada por biópsia bilateral de medula óssea. Também foram computados dados relativos aos esquemas de tratamento inicialmente empregados (quimioterapia, radioterapia, imunoterapia) e resposta ao tratamento inicial. Para avaliação do tratamento inicial, foram utilizados os critérios de resposta definidos por Cheson e colaboradores, sem o emprego de informações fornecidas por

tomografia com emissão de pósitrons por acesso restrito para os pacientes incluídos no estudo e assistidos no sistema de saúde público local (CHESON et al, 2007). Para pacientes com a infecção pelo HIV, a quantificação de células CD4+ em sangue periférico, tomada até 90 dias antes do diagnóstico de linfoma e antes do início do tratamento específico para linfoma, foi considerada.

2.3.3. Técnica de imuno-histoquímica

As colorações imuno-histoquímicas foram realizadas em linfonodos comprometidos por LH ou LNHDGCB, linfonodos estes previamente fixados em formaldeído tamponado a 10% e incluídos em blocos de parafina. Os blocos foram obtidos nos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica do HC-UFTM. Cortes sequenciais com espessura de 4 µm de blocos de parafina foram colocados em lâminas silanizadas e submetidos à coloração por técnica de IHQ usando o sistema de polímeros não biotinizados Novolink® (Leica Biosystems, Reino Unido), segundo as instruções do fabricante (ANEXO B). A recuperação antigênica foi feita através de calor úmido em panela elétrica a vapor por 25 minutos sendo utilizado tampão Tris-EDTA pH 9,0 para o anticorpo anti-CD8 e tampão citrato pH 6,0 para os anticorpos anti-CD56 e anti-granzima B. As lâminas foram incubadas em câmara úmida com anticorpos primários monoclonais (TAB. 1) à temperatura ambiente por 60 minutos. O cromógeno utilizado para a revelação da reação foi a diaminobenzidina (Novocastra®, Reino Unido) e a contracoloração feita com hematoxilina de Harris. Fragmento de baço normal foi utilizado como controle positivo para todas as reações.

Tabela 1 – Clones, isotipos, diluições, tampões para recuperação antigênica e fabricantes dos anticorpos primários usados no estudo por imuno-histoquímica

Anticorpo primário	Clone	Isotipo	Diluição	Recuperação antigênica	Fabricante País
CD8	4B11	IgG2b	1:50	Tris-EDTA pH 9,0	Novocastra® Reino Unido
CD56	CD564	IgG2b	1:100	Citrato pH 6,0	Novocastra® Reino Unido
Granzima B	GrB-7	IgG	1:25	Citrato pH 6,0	Biorbyt® Reino Unido

Fonte: Bula dos fabricantes, 2018. Dos autores, 2018.

2.3.4. Análise imuno-histoquímica

Para cada amostra, a análise imuno-histoquímica foi realizada através da avaliação de pelo menos 10 campos devidamente representativos da neoplasia, em áreas com expressão de maior intensidade (“*hot spot*”) e com melhor contraste, em aumento de 400x por microscopia de luz (microscópio Olympus BX41, Ocular 22mm/10x, Objetiva 40x). Os linfócitos foram considerados imunorreagentes quando o citoplasma se apresentou acastanhado em contraste com o interstício.

Os seguintes critérios foram empregados para a análise semi-quantitativa da intensidade de imunorreação para CD8 e CD56: 0, negativo; 1+, positivo (>0 e $\leq 25\%$); 2+, positivo (>25% e $\leq 50\%$); 3+, positivo (>50 e $\leq 75\%$); e, 4+, positivo (>75% e $\leq 100\%$), com as porcentagens indicando a proporção de células nucleadas marcadas (KIM et al, 2001; KOREISHI et al, 2010). Imunorreação para CD8 e CD56 foi arbitrariamente classificada como forte quando >25% (2+, 3+ ou 4+) ou como ausente/fraca quando $\leq 25\%$ (0 ou 1+). A análise quantitativa da expressão de GzB foi realizada com auxílio de retículo (“*eyepiece grid*”) com área de 0,06 mm² e os resultados expressos em células GzB+/mm². As análises foram realizadas independentemente por dois examinadores (LRO, ACOM). Em caso de discordância inicial na avaliação semi-quantitativa para CD8 e CD56, análise conjunta consensual entre os dois examinadores (LRO + ACOM) em microscópio de múltiplos observadores definiu o resultado final. Para análise quantitativa da expressão de GzB, foi utilizada a média dos resultados dos dois examinadores. Avaliação de fenótipo citotóxico de células tumorais, análise de expressão de EBV ou técnica de IHQ por dupla coloração não foram realizadas.

2.3.5. Análise estatística

Os dados referentes à quantificação de GzB, DHLr (relação entre DHL sérica e o valor do limite superior de normalidade [LSN] do método de análise) e $\beta 2Mr$ (relação entre $\beta 2M$ sérica e o valor do LSN do método de análise) foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As comparações estatísticas foram realizadas com emprego do teste Student t (para dados paramétricos) ou com emprego do teste Mann-Whitney (para dados não paramétricos). Também foi realizada a análise de correlação entre a expressão de GzB e DHLr e a expressão de GzB e $\beta 2Mr$ através do teste de Spearman, seguida por regressão linear. Todas as análises estatísticas foram realizadas através *software* GraphPad Prism versão

5.5 (San Diego, CA), sendo os valores de p abaixo de 0,05 considerados estatisticamente significantes. A análise descritiva de dados clínicos e laboratoriais foi apresentada em valores absolutos e porcentagens.

2.4. RESULTADOS

Foram analisadas amostras de linfonodos de 32 pacientes com linfomas B agressivos (15 pacientes com LH e 17 pacientes com LNHDGCB) com idade mediana de 41 anos (14-82 anos) e tempo médio de seguimento de 40,5 meses (2-120 meses). Dados relativos à idade, gênero, estadiamento de Ann Arbor, presença de sintomas B, infiltração de medula óssea, presença de infecção pelo HIV, DHLr (<LSN vs. ≥LSN) e β2Mr (<LSN vs. ≥LSN) são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Características dos pacientes com LH e LNHDGCB quanto às variáveis clínicas e laboratoriais

Variável\Tipo de Linfoma	LH (n=15)		LNHDGCB (n=17)		Total (n=32)	
Idade (mediana em anos)	38		42		41	
Gênero						
<i>Masculino</i>	8	53,3%	5	29,4%	13	40,6%
<i>Feminino</i>	7	46,7%	12	70,6%	19	59,4%
Estadiamento de Ann Arbor						
<i>I/II</i>	5	33,3%	4	23,5%	9	28,1%
<i>III/IV</i>	10	66,7%	13	76,5%	23	71,9%
Sintomas B						
<i>Ausentes</i>	4	26,7%	2	11,8%	6	18,8%
<i>Presentes</i>	11	73,3%	15	88,2%	26	81,3%
Infiltração de medula óssea						
<i>Ausente</i>	12	80,0%	13	76,5%	25	78,1%
<i>Presente</i>	3	20,0%	4	23,5%	7	21,9%
Infecção pelo HIV						
<i>Ausente</i>	13	86,7%	12	70,6%	25	78,1%
<i>Presente</i>	2	13,3%	5	29,4%	7	21,9%
DHLr						
<LSN	6	40,0%	5	29,4%	11	34,4%
≥LSN	9	60,0%	12	70,6%	21	65,6%
β2Mr						
<LSN	5	50,0%	4	28,6%	9	37,5%
≥LSN	5	50,0%	10	71,4%	15	62,5%
NR	5		3		8	

HIV: vírus da imunodeficiência humana; DHL: desidrogenase láctica sérica; β2M: beta-2-microglobulina sérica; LSN: limite superior da normalidade do método; NR: não realizado.

Fonte: Dos autores, 2018.

Dados relativos ao tratamento são apresentados na tabela 3. Quanto à modalidade inicial de tratamento, apenas três pacientes não receberam tratamento específico, sendo um paciente por recusa e dois pacientes por admissão para assistência com graves disfunções orgânicas. Poliquimioterapia foi a modalidade de tratamento empregada para todos os pacientes. Para pacientes com LH, foi empregada poliquimioterapia baseada em esquema com doxorubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina (ABVD) ou esquema com bleomicina, etoposide, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazina e prednisona (BEACOPP padrão). Metade dos pacientes com LH receberam tratamento radioterápico de campo envolvido. Os esquemas de quimioterapia com ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona (CHOP) ou similares (*CHOP-like*), associados ou não à imunoterapia com rituximabe, foram os utilizados para todos os pacientes com LNHDGCB. Imunoterapia com rituximabe foi utilizada em 46,7% dos pacientes com LNHDGCB tratados, sendo esta baixa proporção resultado da regular disponibilidade do anticorpo monoclonal para pacientes assistidos no sistema público de saúde brasileiro apenas a partir de setembro de 2014 (BRASIL, 2014).

Tabela 3 – Tratamento antineoplásico inicial dos pacientes estudados

Tratamento inicial*	LH (n=14)		LNHDGCB (n=15)		Total (n=29)*	
<i>Poliquimioterapia</i>	14	100,0%	15	100,0%	29	100,0%
<i>Imunoterapia</i>	0	0,0%	7	46,7%	7	24,1%
<i>Radioterapia</i>	7	50,0%	0	0,0%	7	24,1%

* Três pacientes não receberam tratamento antineoplásico específico: LH (n=1), LNHDGCB (n=2).

Fonte: Dos autores, 2018.

Para o desfecho do tratamento inicial para pacientes com LH, 85,8% dos 14 pacientes tratados obtiveram resposta completa. Resposta parcial ou refratariedade ao tratamento inicial foram documentadas em 7,1% dos pacientes para ambos os desfechos. Nenhum paciente morreu em decorrência do tratamento inicial para LH. Os 15 pacientes com LNHDGCB tratados obtiveram taxas de resposta completa, resposta parcial e doença refratária de 66,6%, 6,7% e 6,7%, respectivamente. Apenas um dos pacientes que obtiveram resposta completa apresentou recaída de doença (tempo para recaída de 18 meses). Morte por complicações relacionadas ao tratamento inicial ocorreu em 20% dos pacientes com LNHDGCB (TAB. 4).

Tabela 4 – Desfecho do tratamento inicial

Desfecho do tratamento	LH (n=14)		LNHDGCB (n=15)		Total (n=29)	
<i>Resposta completa</i>	12	85,8%	10	66,6%	22	75,9%
<i>Resposta parcial</i>	1	7,1%	1	6,7%	2	6,9%
<i>Doença refratária</i>	1	7,1%	1	6,7%	2	6,9%
<i>MRT</i>	0	0,0%	3	20,0%	3	10,3%

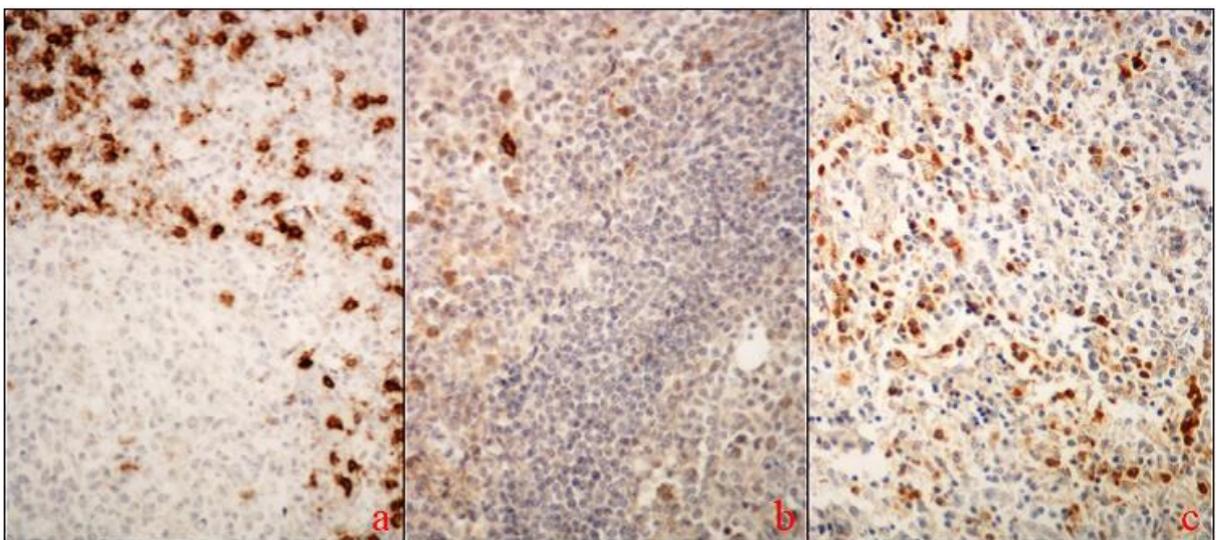
MRT: morte relacionada a tratamento.

Fonte: Dos autores, 2018.

Sete dos pacientes eram portadores da infecção pelo HIV com contagem média de células CD4+ de 221,3/mm³ (variando de 13-382/mm³). Destes, cinco pacientes apresentaram o diagnóstico de LNHDGCB e dois pacientes o diagnóstico de LH com contagem média de células CD4+ em sangue periférico de 281,2 e 71,5/mm³, respectivamente.

Todas as reações de IHQ foram controladas utilizando-se baço normal (FIG. 6). A análise semi-quantitativa da expressão de linfócitos CD8+ revelou forte expressão de CD8 ($\geq 25\%$) em 73,3% e 64,7% das amostras de LH e LNHDGCB, respectivamente (FIG. 7). A expressão de CD56 foi considerada fraca ou ausente ($< 25\%$) em todos os casos analisados (FIG. 8). Linfócitos citotóxicos GzB+ mostraram-se difusamente distribuídos entre as células tumorais (FIG. 9).

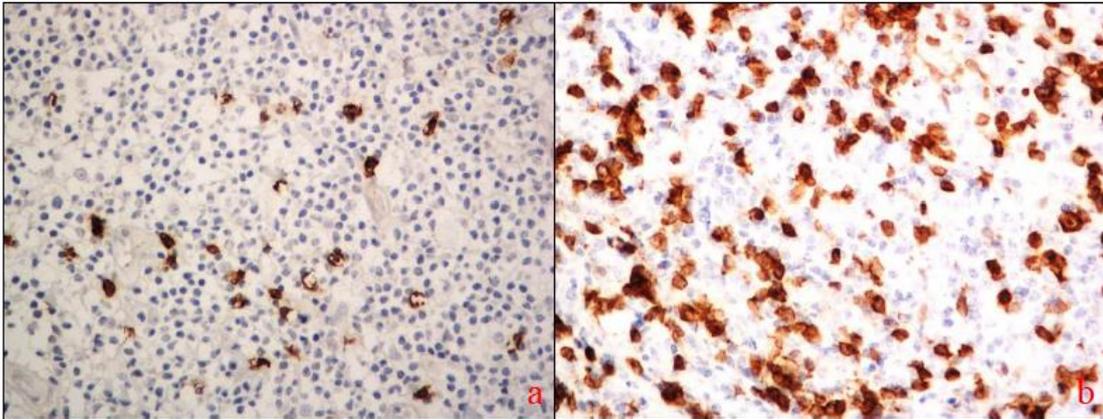
Figura 6 – Controles de reações de imuno-histoquímica para CD8, CD56 e granzima B em amostras de baço normal



Expressão imuno-histoquímica de CD8 (a), CD56 (b) e granzima B (c). Aumento 400x.

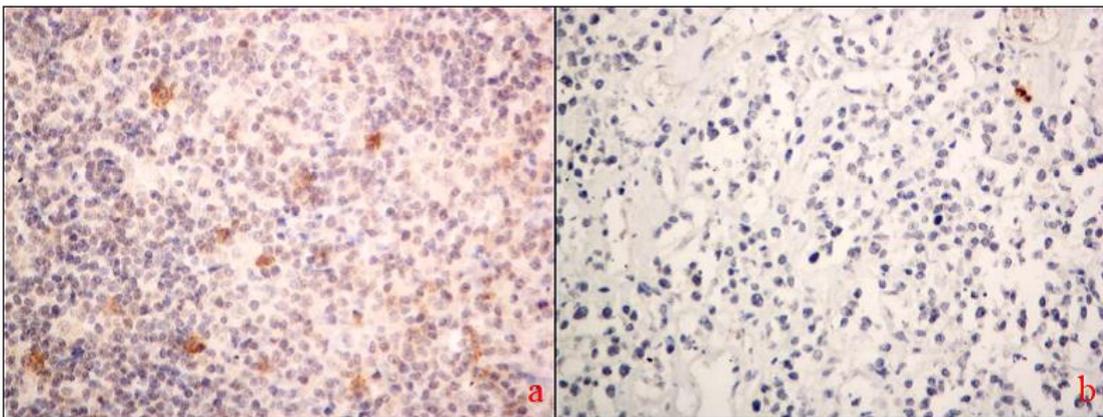
Fonte: Dos autores, 2018.

Figura 7 – Expressão imuno-histoquímica de CD8 em amostras de linfomas



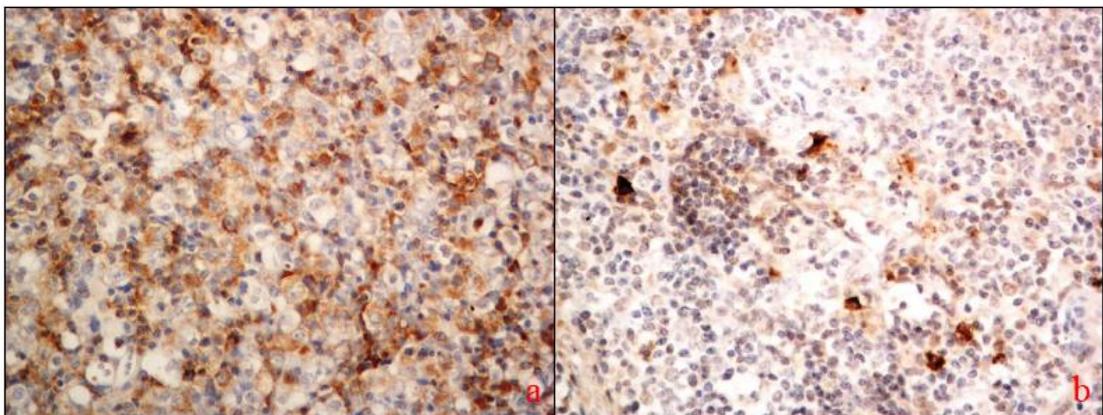
Expressão de CD8 em amostra de linfoma Hodgkin com intensidade 1+ (a) e em amostra de linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B com intensidade 3+ (b). Aumento 400x.
Fonte: Dos autores, 2018.

Figura 8 – Expressão imuno-histoquímica de CD56 em amostras de linfomas



Expressão de CD56 em amostra de linfoma Hodgkin com intensidade 1+ (a) e em amostra de linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B (b) com escassas células reagentes. Aumento 400x.
Fonte: Dos autores, 2018.

Figura 9 – Expressão imuno-histoquímica de granzima B em amostras de linfomas



Expressão de granzima B em amostra de linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B (a) e em amostra de linfoma Hodgkin (b). Aumento 400x.
Fonte: Dos autores, 2018.

Os resultados da análise estatística da expressão de GzB em relação às variáveis clínicas e laboratoriais consideradas encontram-se resumidos na tabela 5.

Tabela 5 – Análise da expressão de granzima B em relação às variáveis clínicas e laboratoriais

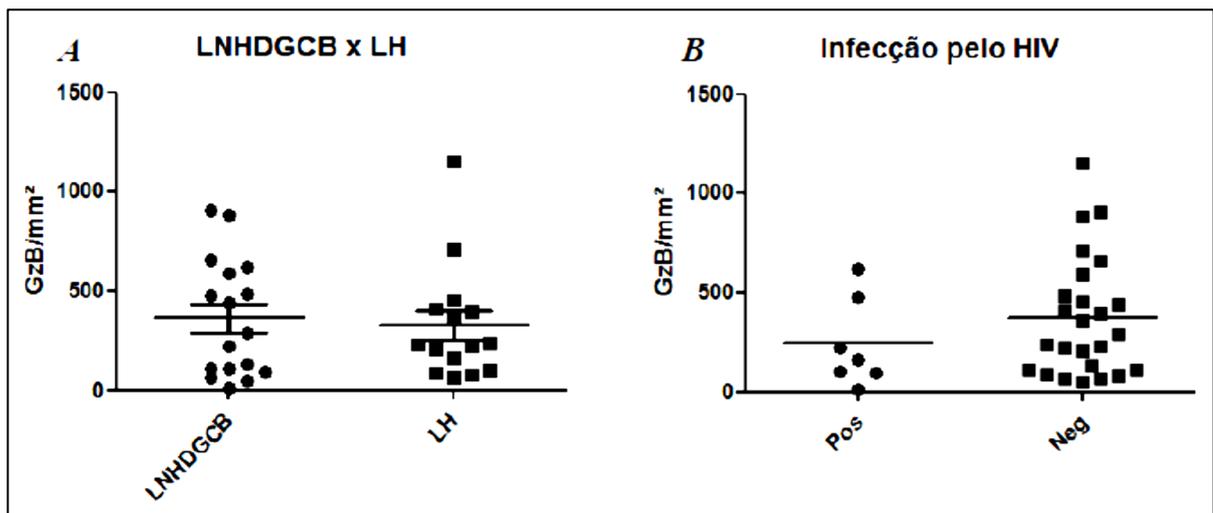
Variável	Expressão de granzima B* (células/mm ²)	Valor de p
Tipo de linfoma		
<i>LH</i>	230,8	0,734
<i>LNHDGCB</i>	287,1	
Infecção pelo HIV		
<i>Ausente</i>	373,6	0,2907
<i>Presente</i>	241,8	
Idade		
<i>≥60 anos</i>	106,7	0,7154
<i><60 anos</i>	235	
Gênero		
<i>Masculino</i>	287,1	0,9694
<i>Feminino</i>	224,2	
DHLr		
<i><LSN</i>	301,6	0,5469
<i>≥LSN</i>	367,3	
β2Mr		
<i><LSN</i>	360	0,2086
<i>≥LSN</i>	224,2	
Expressão de CD8		
<i>Ausente ou fraca</i>	227,5	0,5463
<i>Forte</i>	371,5	
Estadiamento de Ann Arbor		
<i>I/II</i>	455,8	0,025**
<i>III/IV</i>	150	
Infiltração de medula óssea		
<i>Ausente</i>	413	<0,0001**
<i>Presente</i>	101	
Presença de sintomas B		
<i>Ausentes</i>	407,9	0,0958
<i>Presentes</i>	216,3	
Resposta completa ao tratamento		
<i>Não</i>	135	0,2841
<i>Sim</i>	235	

* Dados apresentados em média e comparados através do teste Student t para as variáveis infecção pelo HIV, DHLr e infiltração de medula óssea. Para as demais variáveis, os dados foram apresentados em mediana e comparados pelo teste de Mann-Whitney. LSN: limite superior de normalidade do método. ** Estatisticamente significante.

Fonte: Dos autores, 2018.

Quanto à quantificação da expressão de GzB em linfócitos citotóxicos por área de amostra de linfoma, pacientes com LH apresentaram mediana de 230,8 células GzB+/mm² (65,8–1155,3 células GzB+/mm²) e pacientes com LNHDGCB apresentaram mediana de 287,1 células GzB+/mm² (66,7–901,7 células GzB+/mm²). Não houve diferença na expressão de GzB entre as amostras de pacientes com LH e LNHDGCB (teste de Mann-Whitney, $p=0,7340$) (FIG. 10A). Não foram encontrados depósitos extracelulares de GzB, liberada a partir da degranulação de linfócitos citotóxicos. Quando comparada a expressão média de GzB entre pacientes infectados pelo HIV e não infectados pelo HIV, a despeito do tipo de linfoma, não houve diferença estatisticamente significativa com 241,8 vs. 373,6 células GzB+/mm², respectivamente (teste Student t, $p=0,2907$) (FIG. 10B).

Figura 10 – Estudo da expressão de granzima B em relação ao tipo de linfoma B e presença de infecção pelo HIV



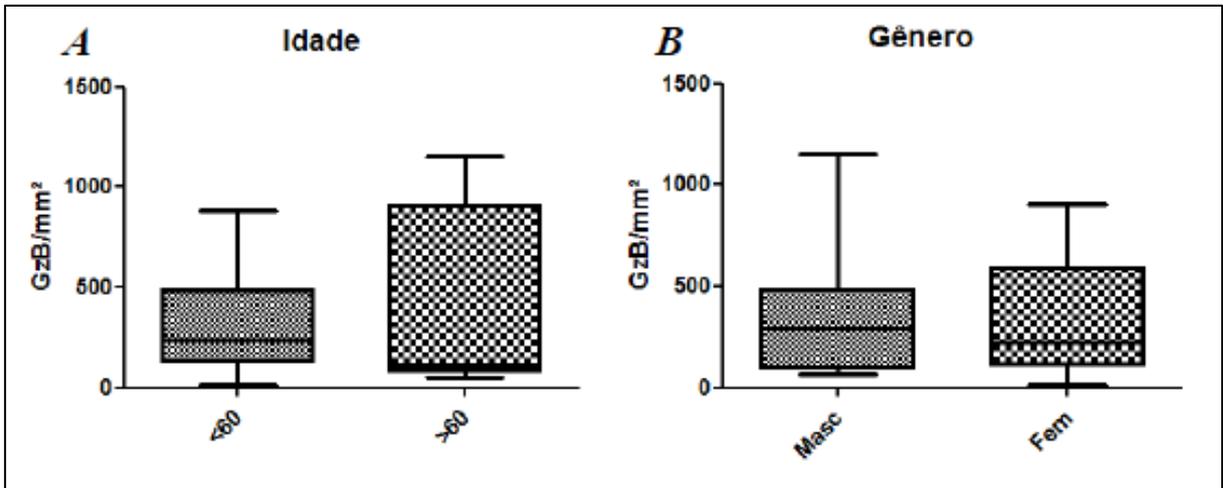
(A) Expressão de granzima B em amostras de pacientes com LNHDGCB e LH (teste de Mann-Whitney, $p=0,7340$). (B) Expressão de granzima B em relação à presença (*Pos*) ou ausência (*Neg*) de infecção pelo HIV (teste Student t, $p=0,2907$).

Fonte: Dos autores, 2018.

No tocante a idade e gênero, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de GzB entre os grupos avaliados (FIG. 11). A expressão de células imunorreagentes para GzB em pacientes com DHLr \geq LSN e $<$ LSN apresentou médias de 367,3 e 301,6 células GzB+/mm², respectivamente (teste Student t, $p=0,5469$). Para β 2Mr \geq LSN e $<$ LSN, a expressão apresentou mediana de 224,2 e 360 células GzB+/mm², respectivamente (teste de Mann-Whitney, $p=0,2086$). Para as análises de correlação, não foi encontrada correlação significativa entre a intensidade da expressão de GzB em amostras de

linfoma e DHLr no momento do diagnóstico (teste de Spearman, $p=0,6513$, $r=0,08306$). No entanto, $\beta 2Mr$ no momento do diagnóstico correlacionou-se de maneira inversa e significativa com a intensidade da expressão de GzB (teste de Spearman, $p=0,0375$, $r=-0,4270$) (FIG. 12).

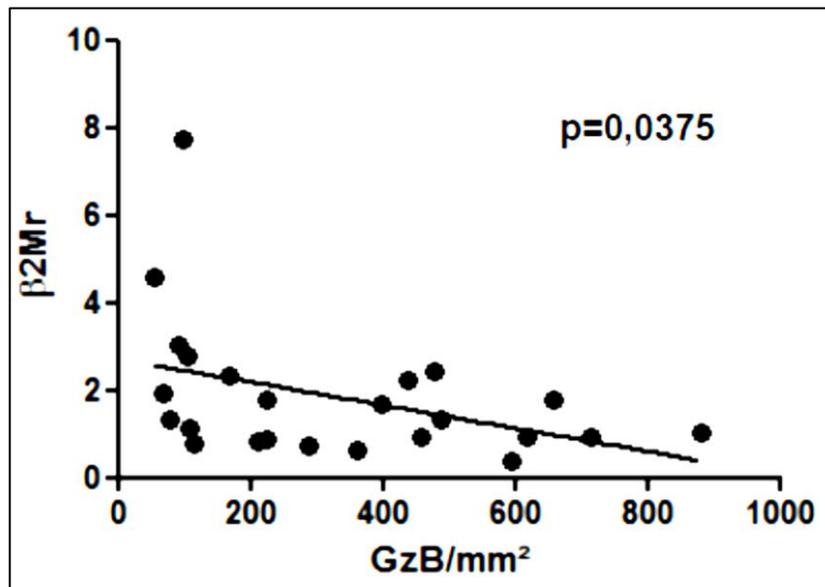
Figura 11 – Expressão de granzima B em relação à idade e gênero



Expressão de granzima B em relação à (A) idade em anos (teste de Mann-Whitney, $p=0,7154$) e (B) gênero (teste de Mann-Whitney, $p=0,9694$).

Fonte: Dos autores, 2018.

Figura 12 – Correlação entre a expressão de granzima B e $\beta 2Mr$



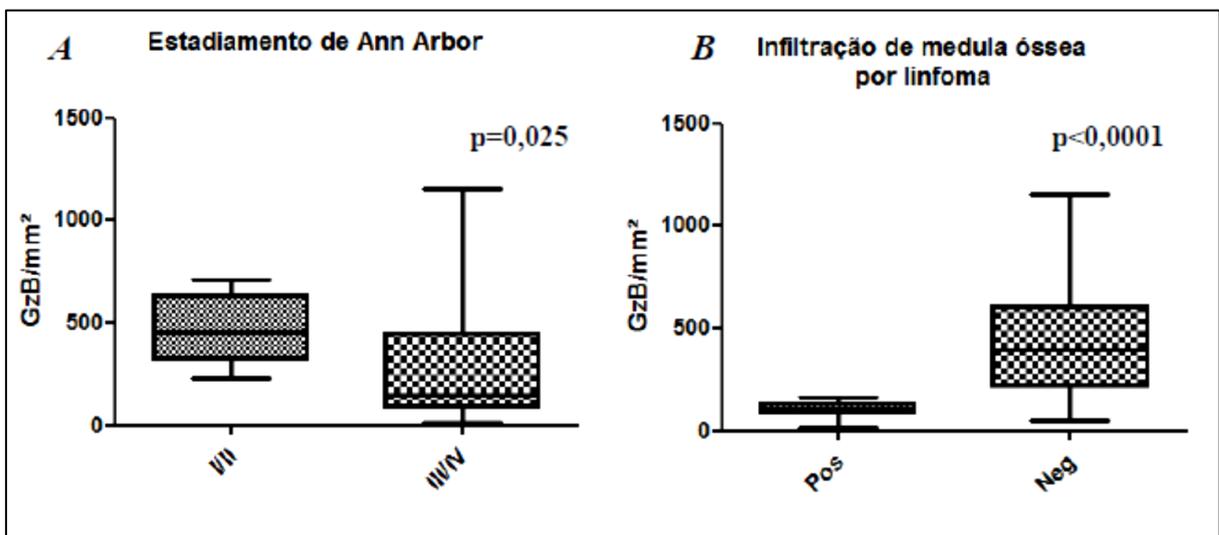
Teste de Spearman seguido de regressão linear, $p=0,0375$, $r=-0,4270$.

Fonte: Dos autores, 2018.

A maior ou menor expressão de CD8 não se relacionou com a expressão de GzB em amostras de linfonodo comprometidos por linfoma, com mediana de 227,5 células/mm² imunorreagentes para GzB em pacientes com expressão ausente ou fraca de CD8 e de 371,5 células/mm² em pacientes com expressão forte de CD8 (teste de Mann-Whitney, p=0,5463).

Considerando o estadiamento tumoral de Ann Arbor, pacientes em estádios precoces (estádios I ou II de Ann Arbor) apresentaram maior expressão tecidual de GzB em relação a pacientes em estádios avançados (estádios III ou IV de Ann Arbor) com contagens medianas de 455,8 e 150 células GzB+/mm², respectivamente (teste de Mann-Whitney, p=0,025) (FIG. 13A). Foi observado também que pacientes com infiltração de medula óssea por linfoma, avaliada por biópsia bilateral de medula óssea no momento do diagnóstico, apresentaram expressão de GzB significativamente reduzida em linfonodos comprometidos por linfoma (contagem média de 101 células GzB+/mm²) em comparação aos pacientes que não apresentaram infiltração da medula óssea (413 células GzB+/mm², teste Student t com correção de Welch, p<0,0001) (FIG. 13B).

Figura 13 – Expressão de granzima B em relação ao estadiamento de Ann Arbor e a infiltração de medula óssea por linfoma



(A) Maior expressão intratumoral de granzima B em linfonodos de pacientes com linfoma em estádios I e II (teste de Mann-Whitney, p=0,025). (B) Menor expressão intratumoral de granzima B em linfonodos de pacientes com infiltração de medula óssea por linfoma (teste Student t com correção de Welch, p<0,0001).

Fonte: Dos autores, 2018.

A presença de sintomas B não interferiu na intensidade de expressão de GzB em amostras de linfoma com expressão mediana de 216,3 vs. 407,9 células GzB+/mm² em pacientes com e sem sintomas B, respectivamente (teste de Mann-Whitney, p=0,0958). Com

relação à resposta à terapia antineoplásica inicial, não houve relação entre a intensidade da infiltração por linfócitos GzB+ nos linfonodos de pacientes que obtiveram critérios que confirmaram a resposta completa ao tratamento (235 células GzB+/mm²) em comparação aos pacientes que não obtiveram resposta completa (135 células GzB+/mm²) (teste de Mann-Whitney, p=0,2841).

2.5. DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou a expressão de GzB em relação às principais variáveis pré-tratamento que tomam parte na previsão de prognóstico de pacientes com linfomas B agressivos. Em estudos anteriores, foi descrita a relação entre a expressão de GzB em amostras tumorais de linfomas e o prognóstico, sendo nestes estudos, o prognóstico aferido através dos desfechos clínicos como sobrevida global, sobrevida livre de progressão e taxa de resposta completa (OUDEJANS et al, 1997; KELLEY et al, 2007; CHANG et al, 2007; MURIS et al, 2004).

A despeito das marcadas diferenças citológicas, arquiteturais e funcionais entre os microambientes tumorais de LH e de LNHDGCB, não houve diferença significativa quanto à expressão de GzB, aferida pela quantificação direta de linfócitos imunorreativos para esta proteína citotóxica, entre estes dois tipos de linfomas. Por este motivo, ambos os tipos de linfomas, que compartilham métodos de estadiamento e ferramentas de previsão de prognóstico, foram considerados em grupo único para análise.

As amostras de pacientes com linfoma e infectados pelo HIV também foram mantidas em grupo único para análise final, por não ter sido encontrada diferença significativa na expressão de GzB nas amostras tumorais destes pacientes em comparação com as amostras de pacientes com linfoma e não infectados pelo HIV (teste de Student t, $p=0,2907$). Estes resultados destoam dos encontrados por Príncipe e colaboradores que evidenciaram menor expressão média de GzB em linfonodos de pacientes com LH e infectados com HIV ($n=9$; $177,7$ células GrZ+/mm²) em comparação a pacientes com LH não infectados pelo HIV ($n=90$; $576,5$ células GrZ+/mm²; $p=0,026$) (PRÍNCEP et al, 2005). Entretanto, outro estudo com emprego de técnicas de IHQ, hibridização fluorescente *in situ* e citometria de fluxo, não encontrou diferença significativa entre a densidade de células citotóxicas ativadas no tecido tumoral de pacientes com linfoma, infectados pelo HIV e não infectados pelo HIV, propondo que as etapas de diferenciação e de ativação de linfócitos citotóxicos CD8+ não seriam modificadas pelo estado de imunodeficiência que caracteriza a infecção pelo HIV (DEVERGNE et al, 1995). Ainda assim, a composição de células imunes inflamatórias não neoplásicas no microambiente tumoral de linfomas associados à infecção pelo HIV permanece a ser esclarecida.

Como demonstrado no presente trabalho, a reduzida expressão de células NK CD56+ nas amostras tumorais de pacientes com linfoma, distintamente ao encontrado para a presença de linfócitos T CD8+, sustenta a impressão de que as células NK não comporiam mecanismo importante para o controle imune citotóxico de linfomas B agressivos. Resultado semelhante foi descrito por Oudejans e colaboradores (OUDEJANS et al, 1997). Esta “perda” da atividade antitumor de células NK pode ser decorrente de mecanismos de escape dispensados por células neoplásicas para mitigar o ataque imune mediado por estas células imunes. Estes mecanismos incluem a regulação negativa de receptores de ativação (NCR, NKG2D) e a regulação positiva de receptores de inibição (KIRs, CD94/NKG2A), tendo como resultado a anergia de células NK (CHRETIEN et al, 2014). Todavia, estes mecanismos de regulação imune não necessariamente implicam na depleção desta população celular no microambiente tumoral, como aqui descrito.

Importância crescente tem sido atribuída à via de controle imune de linfomas mediada por células NK, seja no melhor entendimento de via adicional e incompletamente entendida para a progressão de linfomas, seja na perspectiva do desenvolvimento de drogas, terapias celulares e terapias genéticas capazes de “ressuscitar” a atividade destas células no microambiente tumoral (CHILDS; CARLSTEN, 2015; CHRETIEN et al, 2014). Estas vias terapêuticas potenciais funcionariam por meio da potencialização da função ou sensibilização de células tumorais às vias de citotoxicidade mediadas por células NK. Dentre estas possibilidades terapêuticas estão incluídas (a) a expansão de células NK pelo emprego de citocinas (IL-2, IL-12, IL-15), (b) o emprego de drogas para o incremento funcional de células NK (análogos da talidomida, inibidores de *checkpoints* imunes, anticorpos monoclonais KIR-específicos), (c) o emprego de agentes biológicos para o redirecionamento da citotoxicidade de células NK (anticorpos monoclonais), (d) o uso de drogas para a sensibilização de tumores a células NK (inibidores de proteassoma, antracíclicos, inibidores de histona deacetilase) e (e) a manipulação de *ex vivo* de células NK (CHILDS; CARLSTEN, 2015; CHRETIEN et al, 2014).

Estudos com lenalidomida em pacientes com neoplasias linfoides exemplificam bem esta perspectiva. Lenalidomida e outras drogas imunomoduladoras atuam contra células tumorais de linfoma folicular e leucemia linfóide crônica por efeito citotóxico direto e alteração da atividade de linfócitos T e células NK no microambiente tumoral, este último mecanismo através da reparação de sinapses imunológicas disfuncionais (RAMSAY et al, 2008; RAMSAY et al, 2009). Em pacientes com linfoma de células do manto que

responderam à lenalidomida, houve aumento da proporção de células NK com tendência a aumento da sobrevida livre de progressão e sobrevida global em relação a pacientes não responsivos ao tratamento (HAGNER et al, 2017). O aumento da citotoxicidade pelo aumento da proporção de células NK decorreria do aumento de formação de sinapses imunológicas e do aumento da secreção de GzB (HAGNER et al, 2017).

Na tumorigênese, a instalação e a progressão do câncer resultam de complexa equação em que células imunes, atraídas pelo tumor, e células estromais criam fértil ambiente de sustentação, permitindo que as células neoplásicas persistam alheias aos clássicos mecanismos de controle. Assim, o câncer deixaria de ser considerado, de maneira simplória, apenas consequência do crescimento celular descontrolado, mas também, resultado de falência imunológica progressiva (PRENDERGAST, 2008). Para este fim, a manipulação e o controle das células imunes por células neoplásicas são vias potenciais de evasão imune para progressão do câncer. Nesta direção, a quantidade, a composição e a disposição dos componentes do sistema imune inato e adaptativo variam amplamente entre os diferentes tipos de linfoma com influência no prognóstico (de JONG D; ENBLAD, 2008). A interpretação funcional da infiltração de linfócitos T no microambiente tumoral em linfomas B é marcada por controvérsias e resultados divergentes, não havendo correlação direta entre o grau de infiltração celular e o efetivo desempenho da função citotóxica (CACCIATORE et al, 2012; ASANO et al, 2006). Assim, o melhor entendimento da função efetiva das células imunes tem potencial repercussão na previsão de prognóstico e no fomento de intervenções terapêuticas.

Os escores de prognóstico em linfomas agressivos, baseados predominantemente em variáveis clínicas, dados laboratoriais e estudos de imagem, apresentam limitações, principalmente na identificação de pacientes inicialmente tidos como de bom prognóstico, mas com desfechos desfavoráveis. Assim, a incorporação de informações adicionais acerca da densidade e da efetiva função de células imunes do microambiente tumoral, seja por características histológicas adquiridas por técnica de IHQ, seja por dados obtidos por ensaios funcionais, pode refinar os preditores de prognóstico biológico nestes cânceres.

Estudos anteriores produziram resultados diversos quanto ao significado prognóstico da expressão de GzB em amostras de linfonodos de pacientes com linfomas, prognóstico habitualmente aferido pelos desfechos clínicos sobrevida global, sobrevida livre de progressão e taxa de resposta completa (OUDEJANS et al, 1997; KELLEY et al, 2007; CHANG et al,

2007; MURIS et al, 2004). Em pacientes com LH, maior expressão de GzB foi relacionada com pior prognóstico com menor sobrevida livre de progressão e menor sobrevida global (OUDEJANS et al, 1997). Ainda para LH, outro estudo encontrou que a relação entre a expressão tecidual de FOXP3 e GzB ≤ 1 associou-se à menor sobrevida livre de progressão e menor sobrevida global (KELLEY et al, 2007). Em pacientes com LNHDGCB, infiltração maior do que 5 linfócitos T GzB+ por campo de grande aumento, manteve relação com melhor prognóstico (CHANG et al, 2007). Outro estudo envolvendo pacientes com LNHDGCB, encontrou que a proporção de LTC ativados (relação entre o número de LTC ativados GzB+ e número total de linfócitos CD3+) maior ou igual a 15% foi associada à maior chance de falha na obtenção de resposta completa, menor sobrevida global e menor sobrevida livre de progressão (MURIS et al, 2004). Controvérsias quanto ao prognóstico persistiram em estudos de pacientes com linfoma anaplásico nodal de grandes células (ten BERGE et al, 1999; DUKERS et al, 1999).

Distintamente aos estudos anteriores que objetivaram estabelecer relação entre a expressão de GzB e o prognóstico, este último quantificado pelos desfechos clínicos sobrevida global, sobrevida livre de progressão e taxa de obtenção de resposta completa, o presente trabalho estudou a expressão de GzB em relação às principais variáveis pré-tratamento que tomam parte na composição das ferramentas de previsão de prognóstico, no momento do diagnóstico. Assim, as variáveis tomadas no diagnóstico e antes de qualquer intervenção terapêutica foram estadiamento de Ann Arbor, presença de sintomas B, infiltração de medula óssea, DHL sérica e $\beta 2M$ sérica. Nestas perspectivas, os resultados descritos apontaram que a expressão de GzB foi menor na medida em que os valores séricos de $\beta 2M$ se elevaram acima do LSN do método de análise empregado. A despeito da consolidação de escores com múltiplas variáveis para previsão de prognóstico para LH e LNHDGCB, os valores séricos elevados de $\beta 2M$ permanecem mantendo relação com pior prognóstico nestes linfomas, mesmo para o LNHDGCB após a metódica incorporação de rituximabe para o tratamento (SEO et al, 2016; KANG; YOON; SUH, 2017; WANG et al, 2016). Por conseguinte, o aumento da carga tumoral, o aumento dos valores séricos de $\beta 2M$ e a redução da infiltração de LTC GzB+ na amostra tumoral podem ser associar como eventos marcadores do processo de progressão do câncer.

A expressão de GzB também foi menor com a progressão do linfoma na proporção em que a medula óssea tornou-se comprometida pelo tumor e na proporção em que o estadiamento se tornou avançado (estádio III ou IV). No contexto de progressão do linfoma, a

menor expressão de GzB aqui encontrada poderia explicar falência de imunovigilância decorrente de mecanismos de evasão imune empregados pelo tumor como a perda da expressão de moléculas MHC-I por células neoplásicas ao longo da progressão tumoral (com falha no reconhecimento por linfócitos citotóxicos de antígenos tumorais expressos na superfície da célula tumoral por moléculas MHC-I com conseqüente menor infiltração de células citotóxicas), a indução de anergia ou exaustão local de LTC através da expressão de PD-L1 e PD-L2 e a indução de apoptose de LTC pela via Fas-FasL (POPPEMA; VISSER, 1994; TAGA; TOSATO, 1992; MATSUDA et al, 1994; ROOK et al, 1986; LEE et al, 1998; BRINK et al, 1998; BECKER; CZERNY; BRÖCKER, 1994; YAMAMOTO et al, 2008; GREEN et al, 2010; CHEN BJ et al, 2013). A perda da expressão de moléculas MHC-I na superfície de células tumorais já foi demonstrada por técnica de IHQ em amostras de LNHDGCB, associando-se com menor expressão de LTC GzB+, porém sem associação com desfechos clínicos sobrevida global e sobrevida livre de progressão (MURIS et al, 2004). As conseqüências deste “fenótipo de escape” seria doença mais agressiva com diagnóstico em fases mais avançadas.

Ainda assim, no esforço contínuo de se prever com precisão o prognóstico em linfomas B agressivos, não se deve negligenciar o efeito da quimioterapia na seleção de clones neoplásicos resistentes a mecanismos de apoptose. A elevada infiltração de LTC ativados com especificidade antitumor propiciaria a seleção imune contínua de células tumorais resistentes aos mecanismos de apoptose utilizados por LTC (OUDEJANS et al, 1997; ten BERGE et al, 1999). Por seu turno, esta seleção de células tumorais resistentes à apoptose deflagrada por células citotóxicas justificaria a resistência cruzada aos mecanismos de citotoxicidade mediados por quimioterapia, uma vez que, a maioria das drogas quimioterápicas induz morte celular por apoptose, compartilhando, assim, as vias de sinalização de morte celular deflagradas por células citotóxicas (JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002; FRIESEN et al, 1996; LOS et al, 1997; BOESEN-DE COCK et al, 1999; OUDEJANS et al, 1997). Este mecanismo adquirido de seleção de células tumorais resistentes às vias de apoptose, vias também deflagradas por quimioterapia, fornece evidência de potencial mecanismo a justificar as discrepâncias entre o prognóstico previsto e o prognóstico real (OUDEJANS et al, 1997; MURIS et al, 2004).

São limitações deste estudo a sua natureza retrospectiva e o reduzido número de casos. O potencial emprego dos mecanismos de citotoxicidade mediados por GzB por linfócitos Treg para a supressão de linfócitos citotóxicos não é conhecido e estudo prévio não

demonstrou correlação entre as expressões teciduais de GzB e FOXP3 em pacientes com LH (KELLEY et al, 2007). Assim, no presente estudo, a expressão de GzB não foi considerada relacionada à marcação de linfócitos Treg e nenhuma análise relativa à marcação de FOXP3, CD4 ou CD25 por técnica de IHQ foi realizada.

São consideradas colaborações deste estudo a demonstração de que a resposta imune citotóxica mediada por GzB é predominantemente exercida por LTC CD8+ em detrimento a células NK CD56+ no microambiente tumoral de pacientes com linfomas B agressivos e a demonstração de correlação entre elevação de β 2M sérica e menor expressão de GzB em linfonodos comprometidos por linfoma e a menor expressão de GzB intratumoral quando da presença de infiltração de medula óssea por linfoma e estadiamento tumoral avançado.

3. CONCLUSÕES

A imunoexpressão de GzB, tomada juntamente com os marcadores clássicos de prognóstico de linfomas B agressivos, pode auxiliar no refinamento da avaliação de prognóstico nestes cânceres. O melhor entendimento das relações dinâmicas que marcam a interação entre células imunes e células tumorais no microambiente tumoral poderá auxiliar na definição de marcadores de imuno-histoquímica para a rotina diagnóstica, caracterizados por fácil acesso, ampla aplicabilidade, custos reduzidos e capacidade de aferição fidedigna de prognóstico.

REFERÊNCIAS

- ACHA-ORBEA H, et al. Inhibition of lymphocyte mediated cytotoxicity by perforin antisense oligonucleotides. **EMBO Journal**, Londres, v. 9(12), p. 3815-3819, 1990.
- ADRAIN C, MURPHY BM, MARTIN SJ. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280(6), p. 4663-4673, 2005.
- ALIMONTI JB, et al. Granzyme B induces Bid-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276(10), p. 6974-6982, 2001.
- ANDRADE F, et al. Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. **EMBO Journal**, Londres, v. 26(8), p. 2148-2157, 2007.
- ANSELL SM. Hodgkin lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, Nova York, v. 91(4), p. 434-442, 2016.
- ASANO N, et al. Prognostic Significance of T-Cell or Cytotoxic Molecules Phenotype in Classical Hodgkin's Lymphoma: A Clinicopathologic Study. **Journal of Clinical Oncology**, Nova York, v. 24(28), p. 4626-4633, 2006.
- BALAJI KN, et al. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. **Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 196(4), p. 493-503, 2002.
- BECKER JC, CZERNY C, BRÖCKER EB. Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10. **International Immunology**, Oxford, v. 6(10), p. 1605-1612. 1994.
- BIRD CH, et al. Cationic sites on granzyme B contribute to cytotoxicity by promoting its uptake into target cells. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 25(17), p. 7854-7867, 2005.
- BIRD CH, et al. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 18(11), p. 6387-6398, 1998.
- BLADERGROEN BA, et al. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? **Blood**, Washington, v. 99(1), p. 232-237, 2002.
- BLEACKLEY RC. A molecular view of cytotoxic T lymphocyte induced killing. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 83(6), p. 747-751, 2005.

BOESEN-DE COCK JG, et al. Common regulation of apoptosis signaling induced by CD95 and the DNA-damaging stimuli etoposide and gamma radiation downstream from caspase-8 activation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274(20), p. 14255-14261, 1999.

BOFFETTA P. Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma. **Annals of Oncology**, Oxford, v. 22 (Supplement 4), p. iv27–iv31, 2011.

BOIVIN WA, et al. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 89(11), p. 1195–1220, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer, INCA. **Incidência de Câncer no Brasil**. Brasília: Ministério da Educação, 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 03 abr. 2018.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria SAS/MS nº 956, de 26 de setembro de 2014**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/sas/2014/prt0956_26_09_2014.html>. Acesso em: 03 abr. 2018.

BRATKE K, et al. Increase in granzyme B+ lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 136(3), p. 542-548, 2004.

BRINK AA, et al. Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome of Hodgkin's disease: involvement of apoptosis resistance. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 11(4), p. 376-383, 1998.

BROWNE KA, et al. Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 19(12), p. 8604-8615, 1999.

BROWNE KA, et al. Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275(50), p. 39262-39266, 2000.

BUZZA MS, BIRD PI. Extracellular granzymes: current perspectives. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 387(7), p. 827-837, 2006.

CACCIATORE M, et al. Microenvironment-centred dynamics in aggressive B-cell lymphomas. **Advances in Hematology**, Nova York, v. 2012:138079. doi: 10.1155/2012/138079, 2012.

CAO X, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. **Immunity**, Cambridge, v. 27(4), p. 635-646, 2007.

CHANG KC, et al. Distribution patterns of dendritic cells and T cells in Diffuse Large B-Cell Lymphomas correlate with prognoses. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 13(22 Pt 1), p. 6666-6672, 2007.

CHEN BJ, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 19(13), p. 3462-3473. 2013.

CHESON BD, et al. International Harmonization Project on Lymphoma. Revised response criteria for malignant lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, Nova York, v. 25(5), p. 579-86, 2007.

CHILDS RW, CARLSTEN M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens. **Nature Reviews. Drugs Discovery**, Londres, v. 14(7), p. 487-498, 2015.

CHOWDHURY D, LIEBERMAN J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 26, p. 389-420, 2008.

CHRETIEN AS, et al. Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity. **Frontiers in Immunology**, Laussane, v. 5, p. 122. doi: 10.3389/fimmu.2014.00122. eCollection 2014. 2014.

COLUCCI F, CALIGIURI MA, Di SANTO JP. What does it take to make a natural killer? **Nature Reviews. Immunology**, Londres, v. 3(5), p. 413-425, 2003.

COSTA NL, et al. The clinicopathological significance of the expression of Granzyme B in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, Oxford, v. 46(3), p. 185-189, 2010.

COUPLAND SE. The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas. **Histopathology**, Oxford, v. 58(1), p. 69-80, 2011.

CULLEN SP, BRUNET M, MARTIN SJ. Granzymes in cancer and immunity. **Cell Death and Differentiation**, Londres, v. 17(4), p. 616-623, 2010.

CULLEN SP, MARTIN SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. **Cell Death and Differentiation**, Londres, v. 15(2), p. 251-262, 2008.

de JONG D, ENBLAD G. Inflammatory cells and immune microenvironment in malignant lymphoma. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 264(6), p. 528-526, 2008.

D'ELISEO D, et al. Granzyme B is expressed in urothelial carcinoma and promotes cancer cell invasion. **International Journal of Cancer**, Geneva, v. 127(6), p. 1283-1294, 2010.

DEVERGNE O, et al. Intratumoral activation of CD8-positive cytotoxic lymphocytes in acquired immunodeficiency syndrome lymphomas. **Human Pathology**, Filadélfia, v. 26(3), p. 284-290, 1995.

DUKERS DF, et al. A cytotoxic phenotype does not predict clinical outcome in anaplastic large cell lymphomas. **Journal of Clinical Pathology**, Londres, v. 52(2), p. 129-136, 1999.

DUSTIN ML, LONG EO. Cytotoxic immunological synapses. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 235(1), p. 24-34, 2010.

FAN Z, ZHANG Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Cell & Molecular Immunology**, Pequim, v. 2(4), p. 259-264, 2005.

FEHNIGER TA, et al. Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. **Immunity**, Cambridge, v. 26(6), p. 798-811, 2007.

FRIESEN C, et al. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. **Nature Medicine**, Nova York, v. 2(5), p. 574-577, 1996.

FROELICH CJ, et al. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271(46), p. 29073-29079, 1996.

GALVIN JP, et al. Apoptosis induced by granzyme B-glycosaminoglycan complexes: implications for granule-mediated apoptosis *in vivo*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 162(9), p. 5345-5350, 1999.

GARCIA-SANZ JA, et al. Appearance of granule-associated molecules during activation of cytolytic T-lymphocyte precursors by defined stimuli. **Immunology**, Oxford, v. 64(1), p. 129-134, 1988.

GEIGER B, ROSEN D, BERKE G. Spatial relationships of microtubule organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. **Journal of Cell Biology**, Nova York, v. 95(1), p. 137-143, 1982.

GRAUBERT TA, LEY TJ. How do lymphocytes kill tumor cells? **Clinical Cancer Research**, Delville, v. 2(5), p. 785-789, 1996.

GREEN MR, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Blood**, Washington, v. 116(17), p. 3268-3277, 2010.

GRIFFITHS GM, ISAAZ S. Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. **Journal of Cell Biology**, Nova York, v. 120(4), p. 885-896, 1993.

GROSSMAN WJ, et al. The orphan granzymes of humans and mice. **Current Opinion in Immunology**, Filadélfia, v. 15(5), p. 544-552, 2003.

GRUJIC M, et al. Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280(39), p. 33411-33418, 2005.

HADDAD P, et al. Structural organization of the hCTLA-1 gene encoding human granzyme B. **Gene**, Amsterdam, v. 87(2), p. 265-271, 1990.

- HAGNER PR, et al. Activity of lenalidomide in mantle cell lymphoma can be explained by NK cell-mediated cytotoxicity. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 179(3), p. 399-409, 2017.
- HARRIS JL, et al. Definition and redesign of the extended substrate specificity of granzyme B. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273(42), p. 27364-27373, 1998.
- HERREROS B, SANCHEZ-AGUILERA A, PIRIS MA. Lymphoma microenvironment: culprit or innocent? **Leukemia**, Londres, v. 22(1), p. 49-58, 2008.
- HEUSEL JW, et al. Structure and expression of a cluster of human hematopoietic serine protease genes found on chromosome 14q11.2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266(10), p. 6152-6158, 1991.
- HIEBERT PR, GRANVILLE DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 18(12), p. 732-741, 2012.
- HILL MM, et al. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. **EMBO Journal**, Londres, v. 23(10), p. 2134-2145, 2004.
- HU SX, et al. Expression of endogenous granzyme B in a subset of human primary breast carcinomas. **British Journal of Cancer**, Londres, v. 89(1), p. 135-139, 2003.
- ISAAZ S, et al. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 25(4), p. 1071-1079, 1995.
- JESIONEK-KUPNICKA D, et al. HLA-G and MHC Class II Protein Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis (Warsz)**, Warszawa, v. 64(3), p. 225-240, 2016.
- JIANG X, WANG X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275(40), p. 31199-31203, 2000.
- JOHNSTONE RW, RUEFLI AA, LOWE SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy **Cell**, Cambridge, v. 108(2), p. 153-164, 2002.
- KÄGI D, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. **Nature**, Londres, v. 369(6475), p. 31-37, 1994.
- KÄGI D, et al. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 14, p. 207-232, 1996.
- KANG J, YOON S, SUH C. Relevance of prognostic index with β 2-microglobulin for patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. **Blood Research**, Seoul, v. 52(4), p. 276-284, 2017.

KELLEY TW, et al. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin Lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. **American Journal of Pathology**, Oxford, v. 128(6), p. 958-965, 2007.

KIM GE, et al. The significance of granzyme B expression in patients with angiocentric lymphoma of the head and neck. **Cancer**, Hoboken, v. 91(12), p. 2343-2352, 2001.

KLEIN JL, et al. Genomic organization and chromosomal assignment for a serine protease gene (CSPB) expressed by human cytotoxic lymphocytes. **Genomics**, San Diego, v. 5(1), p. 110-117, 1989.

KO YH, et al. Granzyme B leakage-induced apoptosis is a crucial mechanism of cell death in nasal-type NK/T-cell lymphoma. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 87(3), p. 241-250, 2007.

KONTANI K, et al. Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers. **European Journal of Surgical Oncology**, Londres, v. 27(2), p. 180-186, 2001.

KOREISHI AF, et al. The role of cytotoxic and regulatory T-cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, Hagerstown, v. 18(3), p. 206-211, 2010.

KUPFER A, DENNERT G, SINGER SJ. The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. **Journal of Molecular and Cellular Immunology**, Nova York, v. 2(1), p. 37-49, 1985.

KUPFER A, DENNERT G. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 133(5), p. 2762-2766, 1984.

KURSCHUS FC, et al. Granzyme B delivery via perforin is restricted by size, but not by heparan sulfate-dependent endocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105(37), p. 13799-13804, 2008.

KUWANA M, et al. Autoantibodies to the amino-terminal fragment of beta-fodrin expressed in glandular epithelial cells in patients with Sjögren's syndrome. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167(9), p. 5449-5456, 2001.

KUWANA T, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. **Cell**, Cambridge, v. 111(3), p. 331-342, 2002.

LADÁNYI A, et al. T-Cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 10(2), p. 521-530, 2004.

LAGRUE K, et al. The central role of the cytoskeleton in mechanisms and functions of the NK cell immune synapse. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 256(1), p. 203-221, 2013.

LEE SP, et al. Antigen presenting phenotype of Hodgkin-Reed-Sternberg cells: analysis of the HLA class I processing pathway and the effects of interleukin-10 on Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-cell recognition. **Blood**, Washington, v. 92(3), p. 1020-1030, 1998.

LI H, et al. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, Cambridge, v. 94(4), p. 491-501, 1998.

LI S, YOUNG KH, MEDEIROS LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. **Pathology**, Londres, v. 50(1), p. 74-87, 2018.

LOS M, et al. Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases 9 (ICE/Ced-3 proteases). **Blood**, Washington, v. 90(8), p. 3118-3129, 1997.

LUO X, et al. Bid, a Bcl-2 protein, mediates the release of cytochrome c from mitochondria in response to cell surface death receptors. **Cell**, Cambridge, v. 94(4), p. 481-490, 1998.

MacDONALD G, et al. Mitochondria dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 189(1), p. 131-144, 1999.

MAHRUS S, CRAIK CS. Selective chemical functional probes of granzymes A and B reveal granzyme B is a major effector of natural killer cell-mediated lysis of target cells. **Chemistry & Biology**, Londres, v. 12(5), p. 567-577, 2005.

MALMESTRÖM C, et al. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 196(1-2), p. 159-165, 2008.

MASSON D, et al. Granules of cytolytic T lymphocytes contain two serine esterases. **EMBO Journal**, Londres, v. 5(7), p. 1595-1600, 1986.

MATSUDA M, et al. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. **Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 180(6), p. 2371-2376, 1994.

McILROY D, et al. A triple-mutated allele of granzyme B incapable of inducing apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100(5), p. 2562-2567, 2003.

MEDEMA JP, et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98(20), p. 11515-11520, 2001.

METKAR SS, et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277(51), p. 49523-49530, 2002.

METKAR SS, et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. **Immunity**, Cambridge, v. 16(3), p. 417-428, 2002.

METKAR SS, et al. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. **Immunity**, Cambridge, v. 29(5), p. 720-733, 2008.

MORRIS CS, STUART AE. Reed-Sternberg/lymphocyte rosette: lymphocyte subpopulations as defined by monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Pathology**, Londres, v. 37(7), p. 767-771, 1984.

MÜLLBACHER A, et al. Granzyme A is critical for recovery of mice from infection with the natural cytopathic viral pathogen, ectromelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93(12), p. 5783-5787, 1996.

MÜLLER C, TSCHOPP J. Resistance of cytotoxic T cells to perforin-mediated lysis. Evidence for a lymphocyte membrane protein interacting with perforin. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 153(6), p. 2470-2478, 1994.

MURIS JJF, et al. Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. **Leukemia**, Londres, v. 18(3), p. 589-596, 2004.

NAKAJIMA H, PARK HL, HENKART PA. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolyisin/perforin. **Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 181(3), p. 1037-1046, 1995.

OUDEJANS JJ, et al. Activated Cytotoxic T Cells as Prognostic Marker in Hodgkin's Disease. **Blood**, Washington, v. 89(4), p. 1376-1382, 1997.

PARDO J, et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. **Journal of Cell Biology**, Nova York, v. 167(3), p. 457-468, 2004.

PINKOSKI MJ, et al. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. **Blood**, Washington, v. 92(3), p. 1044-1054, 1998.

POPPEMA S, VISSER L. Absence of HLA class I expression by Reed-Sternberg cells. **American Journal of Pathology**, Filadélfia, v. 145(1), p. 37-41, 1994.

PORES-FERNANDO AT, ZWEIFACH A. Calcium influx and signaling in cytotoxic T-lymphocyte lytic granule exocytosis. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 231(1), p. 160-173, 2009.

PRAKASH MD, BIRD CH, BIRD PI. Active and zymogen forms of granzyme B are constitutively released from cytotoxic lymphocytes in the absence of target cell engagement. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 87(3), p. 249-254, 2009.

PRENDERGAST GC. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. **Oncogene**, Hampshire, v. 27(28), p. 3889-3900, 2008.

PRÍNCEP RB, et al. Decreased number of granzyme B⁺ activated CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in the inflammatory background of HIV-associated Hodgkin's lymphoma. **Annals of Hematology**, Berlin, v. 84(10), p. 661-666, 2005.

RAJA SM, et al. A novel mechanism for protein delivery: granzyme B undergoes electrostatic exchange from serglycin to target cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280(21), p. 20752-20761, 2005.

RAJA SM, et al. Cytotoxic cell granule mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277(51), p. 49523-49530, 2002.

RAMSAY AG, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 118(7), p. 2427-2437, 2008.

RAMSAY AG, et al. Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. **Blood**, Washington, v. 114(21), p. 4713-4720, 2009.

RIEMERSMA SA, et al. Extensive genetic alterations of the HLA region, including homozygous deletions of HLA class II genes in B-cell lymphomas arising in immune-privileged sites. **Blood**, Washington, v. 96(10), p. 3569-3577, 2000.

RIMSZA LM, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. **Blood**, Washington, v. 103(11), p. 4251-4258, 2004.

ROOK AH, et al. Effects of transforming growth factor B on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 136(10), p. 3916-3920, 1986.

ROUSALOVA I, KREPELA E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). **International Journal of Oncology**, Atenas, v. 37(6), p. 1361-1378, 2010.

SEBBAGH M, et al. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. **Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 201(3), p. 465-471, 2005.

SEO S, et al. Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. **Oncotarget**, Nova York, v. 7(47), p. 76934-76943, 2016.

SHI L, et al. Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the time as perforin to trigger apoptosis. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 174(9), p. 5456-5461, 2005.

SHI L, et al. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. **Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 176(6), p. 1521-1529, 1992.

SHIVER JW, HENKART PA. A noncytotoxic mast cell tumor line exhibits potent IgE-dependent cytotoxicity after transfection with the cytolysin/perforin gene. **Cell**, Cambridge, v. 64(6), p. 1175-1181, 1991.

SHIVER JW, SU L, HENKART PA. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. **Cell**, Cambridge, v. 71(2), p. 315-322, 1992.

SHRESTA S, et al. HOW do cytotoxic lymphocytes kill their targets? **Current Opinion in Immunology**, Filadélfia, v. 10(5), p. 581-587, 1998.

SIEGEL R, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2015. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, Nova York, v. 65(1), p. 5–29, 2015.

SLEE EA, ADRAIN C, MARTIN SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, Londres, v. 6(11), p. 1067-1074, 1999.

SPAENY-DEKKING EH, et al. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160(7), p. 3610-3616, 1998.

SUN JR, et al. A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271(44), p. 27802-27809, 1996.

SUTTON VR, et al. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. **Immunity**, Cambridge, v. 18(3), p. 319-329, 2003.

SUTTON VR, et al. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. **Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 192(10), p. 1403-1414, 2000.

SWERDLOW SH, et al. WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. ed.; Lyon, France; **International Agency for Research on Cancer (IARC)**; 2017.

TAGA K, TOSATO G. IL-10 inhibits human T-cell proliferation and IL-2 production. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 148(4), p. 1143-1144, 1992.

TAK PP, et al. The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). **Clinical and Experimental Immunology**, Baltimore, v. 116(2), p. 366-370, 1999.

- TAKAHASHI Y, et al. A substantial number of Rasmussen syndrome patients have increased IgG, CD4+ T cells, TNFalpha, and Granzyme B in CSF. **Epilepsia**, Copenhagen, v. 50(6), p. 1419-1431, 2009.
- ten BERGE RL, et al. Adverse Effects of Activated Cytotoxic T Lymphocytes on the Clinical Outcome of Nodal Anaplastic Large Cell Lymphoma. **Blood**, Washington, v. 93(8), p. 2688-2696, 1999.
- THIERY J, et al. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. **Nature Immunology**, Nova York, v. 12(8), p. 770-777, 2011.
- THORNBERRY NA, et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272(29), p. 17907-17911, 1997.
- TRAPANI JA, et al. Localization of granzyme B in the nucleus. A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271(8), p. 4127-4133, 1996.
- TRAPANI JA, SMYTH MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews. Immunology**, Londres, v. 2(10), p. 735-747, 2002.
- TRAPANI JA, SUTTON VR. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. **Current Opinion in Immunology**, Londres, v. 15(5), p. 533-543, 2003.
- TRAPANI JA. Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. **Cell Death and Differentiation**, Londres, v. 19(1), p. 21-27, 2012.
- TREMBLAY GM, et al. Granzyme activity in the inflamed lung is not controlled by endogenous serine proteinase inhibitors. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 165(7), p. 3966-3969, 2000.
- TRINCHIERI G. Biology of natural killer cells. **Advances in Immunology**, Nova York, v. 47, p. 187-376, 1989.
- VEUGELERS K, et al. Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 17(2), p. 623-633, 2006.
- VOSKOBOINIK I, SMYTH MJ, TRAPANI JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. **Nature Reviews. Immunology**, Londres, v. 6(12), p. 940-952, 2006.
- VOSKOBOINIK I, WHISSTOCK JC, TRAPANI JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. **Nature Reviews. Immunology**, Londres, v. 15(6), p. 388-400, 2015.
- WANG Q, et al. Prognostic value of pretreatment serum beta-2 microglobulin level in advanced classical Hodgkin lymphoma treated in the modern era. **Oncotarget**, Nova York, v. 7(44), p. 72219-72228, 2016.

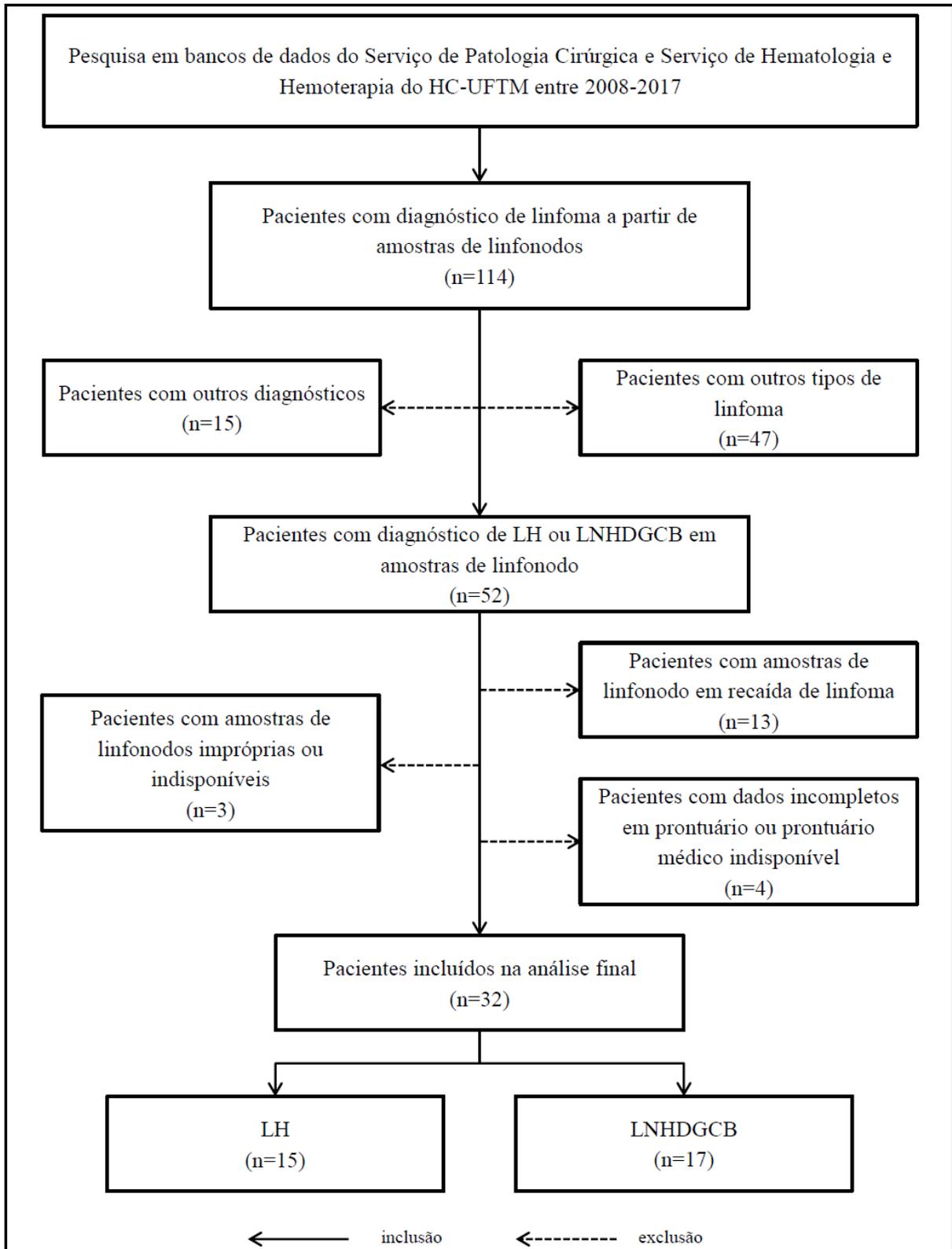
WATERHOUSE NJ, SEDELIES KA, TRAPANI JA. Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. **Immunology and Cell Biology**, Londres, v. 84(1), p. 72-78, 2006.

YAMAMOTO R, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. **Blood**, Washington, p. 111(6), v. 3220-3224, 2008.

ZHANG D, et al. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98(10), p. 5746-5751, 2001.

ZHOU Y, et al. CD4+ T cell-mediated cytotoxicity is associated with MHC class II expression on malignant CD19+ B cells in diffuse large B cell lymphoma. **Experimental Cell Research**, Nova York, v. 362(2), p. 287-292, 2018.

ANEXO A – FLUXOGRAMA COM DADOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DE PACIENTES



LH: linfoma Hodgkin; LNHDGCB: linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B
 Fonte: Dos autores, 2018.

ANEXO B – TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Protocolo de Imuno-histoquímica com Sistema de Polímeros não biotinilados Novolink
(Leica Biosystems, Reino Unido).

Desparafinização:

1. Manter as lâminas em estufa a 60°C, tempo suficiente para aderir o corte e iniciar desparafinização;
2. Imediatamente após retirar da estufa, imergir as lâminas em Xilol por 20 minutos;

Bloqueio de peroxidase endógena:

1. Imergir as lâminas em álcool absoluto (10 imersões em cada uma das três cubas);
2. Imergir as lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, preparada momentos antes do uso (peróxido de hidrogênio 30% P.A. 10 ml + álcool metílico P.A. 90 ml). Manter por 20 minutos;
3. Pré-aquecer a panela elétrica a vapor: encher até a marca permitida o reservatório de água do aparelho com água destilada; montá-lo, ligá-lo na tomada e girar o botão do *timer* do aparelho até o final;
4. Imergir as lâminas em álcool absoluto: 10 imersões em cada uma das 3 cubas;
5. Imergir as lâminas em tampão PBS pH 7,2 – 7,4;

Recuperação antigênica:

1. Pré-aquecer o tampão citrato pH 6,0 no microondas de potência alta por 40 segundos para cuba pequena (40 ml) ou 90 segundos para cuba maior (200 ml);
2. Transferir as lâminas para a cuba com tampão citrato pH 6,0 pré-aquecido.
3. Observar a saturação de vapor no *steamer*, a partir deste momento, transferir a cuba com as lâminas para o aparelho por 25 segundos;
4. Para resfriamento, retirar a cuba com as lâminas da panela elétrica a vapor e manter em temperatura ambiente durante 30 segundos;
5. Imergir as lâminas em tampão PBS pH 7,2 – 7,4 por 5 minutos;

Anticorpos:

1. Pegar as lâminas, uma a uma, secar ao redor dos cortes e pingar duas gotas de soro normal de cabra do kit de reação sobre cada corte, incubar em câmara úmida por 30 segundos (usar o soro em temperatura ambiente);
2. Escorrer o soro normal e pipetar 50 μ L do anticorpo primário designado para cada um dos cortes com consulta do caderno de registros de reação para diluição de cada anticorpo primário (usar o anticorpo primário em temperatura ambiente);
3. Incubar em câmara úmida por 60 minutos ou *overnight*;
4. Lavar cada uma das lâminas com tampão PBS utilizando a garrafa de banhos e imergi-las em dois banhos também de tampão PBS de 5 minutos cada;
5. Pegar as lâminas, uma a uma, secar ao redor dos cortes e pingar duas gotas do bloqueador pós-primário sobre cada corte; incubar em câmara úmida por 30 minutos (usar o anticorpo primário em temperatura ambiente);
6. Lavar cada uma das lâminas com tampão PBS utilizando a garrafa de banhos e imergi-las em dois banhos também de tampão PBS por 5 minutos cada;
7. Pegar as lâminas, uma a uma, secar ao redor dos cortes e pingar duas gotas do complexo polímero sobre cada corte e incubar em câmara úmida por 30 minutos (usar o anticorpo primário em temperatura ambiente);
8. Lavar cada uma das lâminas com tampão PBS utilizando a garrafa de banhos e imergi-las em dois banhos também de tampão PBS por 5 minutos cada;

Revelação da reação:

1. Preparar a solução de DAB (Liquid DAB, Dako, EUA) segundo as instruções do fabricante;
2. Pegar as lâminas, uma a uma, secar ao redor dos cortes e gotejar 50 μ l da solução de DAB por 10 minutos;
3. Parar a reação mergulhando as lâminas em água destilada;
4. Lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos;
5. Contracorar os cortes com hematoxilina de Harris por dois segundos;
6. Lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos;

Desidratação e montagem:

1. Imergir as lâminas em álcool absoluto com 10 imersões em cada uma das 4 cubas;
2. Imergir as lâminas em xilol com 10 imersões em cada uma das 2 cubas;
3. Manter as lâminas na 2^a cuba de xilol enquanto realizar a montagem com lamínulas e

Entellan

ANEXO C – ATESTADO DE APROVAÇÃO



ATESTADO DE APROVAÇÃO

Uberaba, 28 de agosto de 2018.

Defesa de dissertação e exame final de **LEONARDO RODRIGUES DE OLIVEIRA**, candidato (a) ao grau de Mestre (a) em Ciências – Patologia Humana.

A Comissão Examinadora comunica à Coordenadoria do PGCS/UFTM, para os devidos fins, que procedeu, nesta data, ao exame da Dissertação de Mestrado “**IMUNOEXPRESSION DE GRANZIMA B EM LINFÓCITOS CITOTÓXICOS DE LINFONODOS DE PACIENTES COM LINFOMAS B AGRESSIVOS E CORRELAÇÃO DE VARIÁVEIS DE PROGNÓSTICO**” do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (área de concentração Patologia Humana), bem como ao exame final.

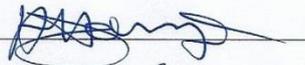
O (a) candidato (a) foi considerado (a) APROVADO.

A COMISSÃO:

Dr. Hélio Moraes de Souza

Dr. José Salvador Rodrigues de Oliveira

Dr. Paulo Roberto Juliano Martins



 José Salvador R. de Oliveira

 Paulo Roberto Juliano Martins

