



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FARMACOGENÉTICA APLICADA À TERAPÊUTICA DOS
LINFOMAS**

Trabalho submetido por
Cristiana Mafalda dos Santos Almeida
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2015



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FARMACOGENÉTICA APLICADA À TERAPÊUTICA DOS
LINFOMAS**

Trabalho submetido por
Cristiana Mafalda dos Santos Almeida
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro

Outubro de 2015

Agradecimentos

Esta dissertação é o culminar de uma etapa onde pude contar com a colaboração, empenho e incentivo de várias pessoas às quais quero expressar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, como não podia deixar de ser, aos meus pais, por me terem apoiado incondicionalmente, em todas as etapas da minha vida, mesmo quando isso implicou fazer alguns sacrifícios e aos meus irmãos, pelo companheirismo, amizade e atenção que sempre me dedicaram.

À minha orientadora, a Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro, por todo o apoio e disponibilidade que manifestou ao longo da elaboração desta monografia.

E, finalmente, a todos os meus amigos, por fazerem parte da minha vida, em especial ao grupo de amigos da faculdade, com quem partilhei tantos bons e maus momentos e que tornaram mais alegre, interessante e animada a minha passagem por este lugar.

Resumo

Os linfomas são tumores malignos hematológicos, com origem no sistema linfático, com distintas características morfológicas, imunofenotípicas, genéticas, moleculares e clínicas. Estes podem ser, de uma forma geral, classificados em linfomas de Hodgkin e Linfomas não Hodgkin. Dentro dos linfomas não Hodgkin existem já cerca de 60 subtipos identificados, entre os quais se destacam o Linfoma Difuso de grandes células B e linfoma folicular como os mais frequentes.

A quimioterapia, por vezes em conjunto com a radioterapia, mantém-se a base do tratamento das neoplasias hematológicas e, apesar das longas taxas de sobrevivência, os casos de recidiva são significativos, verificando-se por vezes toxicidade decorrente destes tratamentos. Mutações que surgem no tumor ou no indivíduo ou a combinação de vários factores podem estar na base da diferença inter-individual das respostas ao tratamento destes tumores.

Esta variabilidade genética representa cerca de 15% a 30% das diferenças no metabolismo e eficácia dos fármacos nos diferentes indivíduos. As principais variações na sequência do DNA são os SNPs, que têm uma frequência de, pelo menos, 1% na população.

Existem descritas na literatura evidências da influência de diversos polimorfismos no desenvolvimento, tratamento e prognóstico dos linfomas. Por exemplo, a eficácia e a toxicidade da doxorrubicina, um dos agentes utilizados no tratamento do linfoma difuso de grandes células B, parecem ser afectadas por SNPs em genes que codificam subunidades da NADPH. Em relação ao linfoma de Hodgkin verifica-se que polimorfismos nas enzimas de metabolização UGT1A1, GSTA1, GSTP1, GSTT1 e GSTM1 se relacionam com o risco e resposta à terapêutica.

A análise do genoma permitirá o crescimento do entendimento destas alterações na patogénese desta doença, o seu impacto na farmacoterapia, a identificação de biomarcadores e, em última análise, o desenvolvimento de novos fármacos e terapias mais eficazes e com menos efeitos tóxicos.

Palavras-chave: Linfoma, farmacogenética, SNPs, genoma

Abstract

Lymphomas are haematological malignancies with origin in the lymphatic system with distinct morphologic, immunophenotypic, genetic, molecular and clinical characteristics. They can be broadly classified into non Hodgkin lymphomas and Hodgkin lymphomas. Among the non Hodgkin lymphomas, over 60 subtypes have already been identified, of which diffuse large B cell lymphoma and follicular lymphoma are the two most common.

Chemotherapy, sometimes along with radiotherapy, is still the standard treatment for haematological malignancies and, despite the long survival rates, relapse cases are still significant and sometimes adverse reactions are observed, as a consequence of this treatments. Mutations in the tumour of the patient or the combination of several factors can be the reason for the differences in the response to treatment observed in different individuals.

There are evidences described in the literature of the association between several polymorphisms and lymphoma progression, treatment and prognosis. For example the efficacy and cardiotoxicity of doxorubicin, a drug used in the treatment of diffuse large B cell lymphoma, seems to be affected by SNPs in genes that codify for NADPH subunits. Also, polymorphisms in the metabolizing enzymes UGT1A1, GSTA1, GSTP1, GSTT1 and GSTM1 are associated with risk and treatment response in patients with Hodgkin's lymphoma.

The genome analysis will allow further understanding of this variability in the pathogenesis of lymphomas and its impact on the pharmacotherapy, identification of biomarkers and, ultimately, the development of new drugs and more efficient therapies with less toxic effects.

Keywords: Lymphoma, pharmacogenetics, SNP, genome

Índice Geral

1.Introdução.....	15
2.Linfomas.....	17
2.1.2.Linfomas de células T e NK.....	21
2.2.Linfomas de Hodgkin.....	22
3.Epidemiologia	23
3.1.Linfoma não Hodgkin	23
3.2.Linfoma de Hodgkin	25
4.Diagnóstico e Tratamento	27
4.1.Diagnóstico.....	27
4.2.Avaliação da extensão	28
4.3.Tratamento de linfomas não Hodgkin.....	29
4.3.1.Linfomas de células B	29
4.3.2.Linfomas de células T	31
4.4.Tratamento do Linfoma de Hodgkin.....	32
5.Farmacogenética	33
5.1.Polimorfismos genéticos em genes que codificam de enzimas de metabolização	35
5.2.Enzimas de fase I.....	35
5.3.Enzimas de fase II	36
5.4.Proteínas de transporte.....	37
6.R-CHOP e o Linfoma difuso de grandes células B.....	41
6.1.Doxorrubicina.....	42
6.2.Rituximab.....	51
6.3.Ciclofosfamida	53
7. Implicações Farmacogenéticas na terapêutica do linfoma não Hodgkin: polimorfismos e biomarcadores	55
8. Implicações farmacogenéticas no linfoma de Hodgkin: polimorfismos e biomarcadores	61
9.Perspectivas Futuras	65
9.1.Avanços tecnológicos.....	65
9.2.Mutações recorrentes e oportunidades terapêuticas.....	67
10.Conclusão.....	73
Bibliografia	75

Índice de Figuras

Figura 1- Linfomas não Hodgkin em diferentes fases do desenvolvimento de células B	20
Figura 2- Desenvolvimento de células T.....	22
Figura 3- Taxas de incidência dos subtipos de NHL.....	23
Figura 4- Taxa de incidência estimada para ambos os sexos em Portugal em 2012 de acordo com o European Cancer Observatory	24
Figura 5- Incidência estimada do Linfoma de Hodgkin para ambos os sexos em 2012 na Europa de acordo com o European Cancer Observatory	26
Figura 6- Proteínas de transporte e mecanismos de resistência presentes nas células cancerígenas.....	37
Figura 7- Principais genes farmacogenéticos candidatos no mecanismo de acção doxorrubicina.....	43
Figura 8- Estrutura do complexo enzimático NADPH.....	44
Figura 9- Genes candidatos envolvidos na cardiotoxicidade induzida por antraciclinas	50
Figura 10- Mecanismo de acção do Rituximab	52
Figura 11- Metabolismo da ciclofosfamida.....	54
Figura 12- Evolução dos métodos de detecção genética	66
Figura 13- Alvos terapêuticos na via de sinalização BCR	68
Figura 14- MYD88 e TLR como alvos terapêuticos em ABC DLBCL.....	69
Figura 15- Potenciais alvos terapêuticos e os novos fármacos em desenvolvimento para os NHL	71

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Alguns subtipos de NHL de acordo com a Classificação da WHO 2008, adaptado de Shankland, Armitage, & Hancock, 2012.....	17
Tabela 2 –Ann Arbour	29
Tabela 3 – Substratos anticancerígenos das proteínas transportadoras da família ABC, adaptado de Joyce 2015	38

Lista de abreviaturas

ABCB1/MDR1-ATP-binding cassette, sub-família B membro 1/ *Multidrug resistance protein 1*

ABCC2/MRP2- ATP-binding cassette, sub-família C membro 2/ *Multidrug resistance – associated protein 2*

ABCG2/BCRP2- ATP-binding cassette, sub-família G membro 2 /*Breast cancer resistance protein 2*

ABVD- Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina

Akt-Proteína cinase B

BAFF-Factor activador de célula B

BCR-Receptor das células B

BEACOPPesc- Beomicina, Etopósido, Adriamicina, Ciclofosfamida, Oncovin® (vincristina), Procarbacin e Prednisolona escalado

bFGF -Factor de crescimento fibroblástico básico

BTK-Tirosina cinase de Briton

CBM- Complexo CARD11-BCL10-MALT1

CBR1- Carbonil reductase 1

CBR3- Carbonil reductase 2

CHOEP-Ciclofosfamida, Doxorubicina, Oncovin® Vincristina, Etoposido, Prednisolona

CHOO-Ciclofosfamida, Hidroxiadunorrubicina, , Oncovin® (vincristina), Prednisolona

CLL-Leucemia linfoblástica crónica

DLBCL- Linfoma difuso de grandes células B

EFS-*Event Free Survival*

FDA- *Food and Drug Administration*

FISH- Hibridização fluorescente *in situ*

FL-Linfoma folicular

FLIPI- Índice de Prognóstico Internacional para o Linfoma Folicular

GST-Glutathione S-transferase

GSH-Glutathione

hCNT- *Human concentrative nucleoside transporters*

hENT1- *Human equilibrative nucleoside transporter 1*

HL-Linfoma de Hodgkin

hOCT1- Human Organic Cation Transporter 1

IFRT-Involved Field Radiotherapy

IL-1- Interleucina 1

IPI- Índice de Prognóstico Internacional

IRAK- Cinase associada ao receptor da interleucina-1

ISRT-*Involved Site Radiotherapy*

MALT-Tecido linfóide associado à mucosa

MCL-Linfoma de células do manto

MZL- Linfoma da zona marginal

mRNA- RNA mensageiro

MRP1- *Multi drug related resistance protein*

mTOR- Alvo da rapamicina em mamíferos

MTHFR-Metileno-tetra-hidrofolato reductase

NCBI-National Center for Biotechnology Information

NF- κ B- Factor nuclear kappa B

NHL-Linfoma não Hodgkin

NK- *Natural Killer*

NLPHL- Linfoma de Hodgkin predominantemente linfocitário

OATPs-*Organic anion transporting polypeptides*

PI3K-Fosfoinositídeo 3-quinase

PKC β - Proteína cinase C β

PTEN- Homólogo da fosfatase e tensina

R-CHOP- Rituximab- Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina, Prednisolona

R-CVP- Rituximab-Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisolona

R-DHAP- Rituximab-Dexametasona, Citarabina Cisplatina

RFC- *Reduced folate carrier*

R-ICE- Rituximab-Ifosfamida, Carboplatina, Etoposido

SLC22A1- *Solute Carrier* família 22 membro 1

SLL- Linfoma linfocítico de pequenas células

SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*

SYK- Tirosina cinase do baço

TAK1-Cinase activada pelo factor de crescimento β

TCR- Receptor de célula T

TIR-Receptor Toll/Interleucina-1

TLR- Receptor *Toll-Like*

TPMT-Tiopurina S-metiltransferase

TRAF6- Factor 6 associado ao receptor do factor de necrose tumoral

WHO- World Health Organization

VEGF- Factor de crescimento vascular endotelial

1.Introdução

Os linfomas são neoplasias que afectam o sistema linfático que continuam a ser uma causa de morbidade considerável em todo o mundo. As estimativas apontam para cerca de 450 000 novos casos e 225 000 mortes por ano. Estas neoplasias apresentam um conjunto heterogéneo de características morfológicas e clínicas cuja resposta ao tratamento varia significativamente ente os indivíduos (Intlekofer & Younes, 2014).

Por vezes os fármacos, apesar de administrados na mesma dose, não produzem o mesmo efeito em todos os doentes, verificando-se em alguns casos efeitos tóxicos. Esta disparidade na resposta ao tratamento pode ser atribuída a diversos factores como a idade, o sexo, co-morbilidades, factores ambientais e interacções entre fármacos mas, para alguns doentes, a razão para esta diferença pode ser genética (Charlab & Zhang, 2013; Kitzmiller, Groen, Phelps, & Sadee, 2011).

Deste modo, surge a farmacogenética que tem como objectivo o estudo da influência dos genes na resposta aos fármacos, nomeadamente dos genes envolvidos em processos de metabolização e transporte de fármacos ou relacionados com alvos terapêuticos. A sequenciação do genoma em grande escala, juntamente com os avanços tecnológicos, levaram a uma evolução do termo farmacogenética para a farmacogenómica. Este último diz respeito à análise de todo o espectro de genes presentes no genoma humano. No entanto, os dois termos são intercambiáveis (Weng, Zhang, Peng, & Huang, 2013).

Em oncologia as mutações somáticas (encontradas no tumor) e as mutações germinativas (herdadas) podem influenciar a progressão da doença e/ou a resposta à terapia ou seja, trata-se de biomarcadores de prognóstico, quando associados à progressão da doença, ou preditivos, que podem ser utilizados na identificação de populações que melhor responderão a determinada terapia (McLeod, 2013).

As variações mais frequentes na sequência de DNA são SNPs, que dizem respeito à substituição de um nucleótido por outro, e representam cerca de 90% das variações no genoma humano. Graças ao seu predomínio no genoma humano (uma a cada 1000 pb) estes têm sido amplamente estudados em oncologia (Bag, Bag, & Jyala, 2012). A grande variabilidade dos genomas tumorais, juntamente com a pequena margem terapêutica dos agentes anticancerígenos faz com que esta seja uma área bastante apelativa para a aplicação da farmacognética, culminando na terapia individualizada (Charlab & Zhang, 2013).

Algumas destas variações e o seu impacto no tratamento reflectem-se já na prática clínica. No caso de variações da linha germinativa, por exemplo, a FDA recomenda a genotipagem de três SNPs da enzima TPMT, que metaboliza a 6-mercaptopurina, um antimetabolito que impede a síntese do DNA. Estas variantes (rs1800462 (G>C), rs1142345 (A>G) e rs1800460 (G>A)) foram associadas a uma baixa actividade desta enzima e consequentes efeitos tóxicos pelo que, nestes doentes, deve ser feita uma redução da dose de 6-mercaptopurina (Weng et al., 2013).

A farmacogenética anuncia, assim, uma mudança do paradigma da medicina, com a possibilidade de um tratamento individualizado, de acordo com o genótipo, assim como no desenvolvimento de novos fármacos (Lee et al., 2014).

Os linfomas são um grupo heterógeno de neoplasias linfáticas que são, de uma forma abrangente, classificados em linfomas de Hodgkin e Linfomas não Hodgkin (Campo et al., 2011).

Esta monografia terá então como alvo de estudo o DLBCL, o linfoma não Hodgkin mais comum, e o impacto de diversos polimorfismos na resposta dos doentes aos fármacos utilizados no tratamento de 1ª linha: Rituximab, Ciclofosfamida e Doxorrubicina. Estes polimorfismos encontram-se em diversos genes que codificam para enzimas de metabolização, genes que codificam proteínas transportadoras e genes envolvidos no mecanismos de reparação do DNA. A análise de perfis de expressão genética permitiu identificar a presença de diversas mutações em doentes com DLBCL, com relevância biológica e possível impacto na gestão da terapêutica.

Serão ainda abordados outros linfomas não Hodgkin e alguns polimorfismos cujos estudos demonstraram ter impacto na progressão e prognóstico destas neoplasias hematológicas.

No que diz respeito ao linfoma de Hodgkin, apesar da taxa de cura ser cerca 89%, cerca de 15% a 20% dos doentes morrem no seguimento de uma recidiva (Altés et al., 2013). Apesar de escassos, existem alguns estudos que sugerem o impacto de determinados polimorfismos no risco e na progressão deste cancro. Estes serão igualmente analisados nesta monografia.

A metodologia utilizada na elaboração desta monografia foi a recolha e posterior análise da literatura disponível em bases de dados de artigos científicos, nomeadamente o PUBMED.

Dissertação redigida segundo o antigo acordo ortográfico

2.Linfomas

Linfoma é o nome que se dá a um grupo de tumores malignos que afectam o sistema linfático. O linfoma desenvolve-se quando um linfócito sofre uma alteração maligna e se multiplica originando um tumor. Estes tumores provocam um aumento dos nódulos linfáticos e podem afectar outros locais que constituem o sistema imunitário, nomeadamente pele e outros órgãos. (Leukemia & Lymphoma Society, 2013)

A classificação de tumores de tecidos hematopoiéticos e linfáticos da WHO, alterada em 2008 distingue as neoplasias linfáticas em 5 grupos:

1. Neoplasias linfóides precursoras
2. Neoplasias de células B maduras
3. Neoplasias de células T maduras ou células *Natural Killer* (NK)
4. Linfoma de Hodgkin
5. Perturbações linfoproliferativas associadas a imunodeficiência

Esta classificação baseia-se nas características morfológicas, imunofenotípicas, genéticas, moleculares e clínicas (Swerdlow et al., 2008)

Tabela 1- Alguns subtipos de NHL de acordo com a Classificação da WHO 2008 (adaptado de Shankland, Armitage, & Hancock, 2012)

LINFOMAS NÃO HODGKIN	
CÉLULAS B	
CÉLULAS B PERCURSORAS	Leucemias ou Linfoma de células B precursoras
CÉLULAS B MADURAS	Linfoma linfocítico de pequenas células, Linfoma linfoplasmacítico, Linfoma esplénico da zona marginal, Linfoma extranodal de células B da zona marginal, Linfoma nodal de células B da zona marginal, Linfoma folicular, Linfoma difuso de grandes células B, Linfoma de células do manto, Linfoma de Burkitt
PROLIFERAÇÕES DE CÉLULAS B DE POTENCIAL MALIGNO INCERTO	Granulomatose linfomatóide, Distúrbios linfoproliferativos pós-transplante

CÉLULAS T E NK	
CÉLULAS T PERCURSORAS	Leucemia linfoblástica ou linfoma de células T precursoras
CÉLULAS T E NK MADURAS EXTRANODAIS	Micose fungóide, Linfoma anaplástico de grandes células, Linfomas extranodal de células T ou NK, Linfomas associado a enteropatia, Linfoma hepatoesplênico, linfoma de aparência paniculítica subcutâneo, Linfoma cutâneo primário CD8+, Linfoma cutâneo primário de células T γ/δ , Linfoma cutâneo primário CD4+
CÉLULAS T E NK MADURAS NODAIS	Linfoma periférico de células T não especificado, Linfoma angioimunoblástico, Linfoma anaplástico de grandes células ALK positivo/negativo, Linfoma/Leucemia de células T

Apesar da classificação atribuída pela WHO, anteriormente apresentada, tradicionalmente, os linfomas de Hodgkin têm sido considerados em separado dos outros tipos de linfomas, os designados linfomas de não Hodgkin (alguns enumerados na Tabela 1).

Por sua vez, as perturbações linfoproliferativas associadas a imunodeficiência são proliferações linfóides que surgem como consequência de estados de imunodeficiência (Swerdlow et al., 2008).

Nesta monografia serão abordados os linfomas de Hodgkin, alguns dos principais subtipos dos linfomas de Não Hodgkin e as possíveis variações genéticas que podem influenciar o seu desenvolvimento e o seu tratamento.

2.1.Linfomas Não Hodgkin

2.1.1.Linfomas de células B

Cerca de 85% a 90% dos linfomas não Hodgkin surgem de células B. No seu processo normal de diferenciação as células B precursoras (linfoblastos-B) sofrem um mecanismo de recombinação genética dos genes que codificam as regiões variáveis da cadeia pesada e leve das imunoglobulinas, para formar o receptor da célula B (BCR). Este processo é resultado de uma quebra da cadeia dupla de DNA por acção das enzimas RAG1 e RAG2 e é denominado de recombinação V(D)J. Uma vez expresso o receptor,

as células saem então da medula óssea e tornam-se maduras (Shankland, Armitage, & Hancock, 2012; Georg Lenz, M.D., and Louis M. Staudt, M.D., 2010).

Os genes da imunoglobulina de cadeia pesada (IgH) derivam de vários elementos V (variável), D (diversidade) e J (junção) enquanto as cadeias leves surgem da recombinação de elementos V e J. Apenas as células que adquirirem os genes da região variável das cadeias leve e pesada que possam ser traduzidos numa proteína sobrevivem. Caso tal não aconteça, a célula sofrerá apoptose (Nogai, Dörken, & Lenz, 2011).

No centro germinativo do nódulo linfático ocorre, por estimulação de antígenos e sinais emitidos pelos linfócitos-T, a activação das células B maduras. Este local parece ser a fonte de muitos linfomas (Shankland, Armitage, & Hancock, 2012).

Durante a reacção no centro germinativo, mais precisamente na zona cinzenta, dá-se a rápida expansão dos centroblastos (células B em rápida divisão com núcleo não clivado), quando em contacto com as células dendríticas foliculares e as células T antígeno-específicas. Quando entram na zona clara do centro germinativo os centroblastos convertem-se em centrócitos (células B com o núcleo clivado que não se dividem), retiram o antígeno das células dendríticas e apresentam-no às células T. Os centrócitos podem diferenciar-se em células de memória B ou plasmócitos ou podem retornar a centroblastos. São duas as possíveis modificações do DNA das células B que podem provocar alterações nos receptores destas células:

- Hipermutação somática - mutações somáticas nos genes da região variável de *imunoglobulinas* (IgV)
- Recombinação da mudança de classe de imunoglobulinas -de IgM para IgA, IgB ou IgE

Estes processos, ambos dependentes da enzima AID (desaminase induzida por activação) vão assim, interferir na especificidade das células B para um antígeno particular (Wagner, Ahearne, & Ferrigno, 2011). As células B que sofrem mutações IgV não sofrem apoptose graças à re-expressão do BCL2 e de IRF4/MUM1 (Ott et al., 2009).

Estas alterações genéticas, apesar de essenciais para o bom funcionamento do sistema imunitário, podem ser a causa de diversas neoplasias linfáticas. A recombinação V(D)J, a hipermutação somática e a recombinação da mudança de classes representam processos críticos no desenvolvimento de neoplasias (Figura 1) (Nogai, Dörken, & Lenz, 2011).

Exemplos de translocações que ocorrem durante a recombinação V(D)J são a t(14;18) e a t(11;14). Na primeira, que é detectada em praticamente todos os casos de

linfoma folicular e em alguns casos DLBCL, ocorre o BCL2 do cromossoma 18 é translocado para a região activa IgH no cromossoma 14, e leva a uma desregulação do gene BCL2 que previne a morte celular programada (Nogai, Dörken, & Lenz, 2011).

No linfoma de Burkitt, por exemplo, verifica-se que esta translocação leva a uma justaposição do gene MYC no cromossoma 8 com o locus IgH causando uma regulação do gene MYC (Shankland, Armitage, & Hancock, 2012).

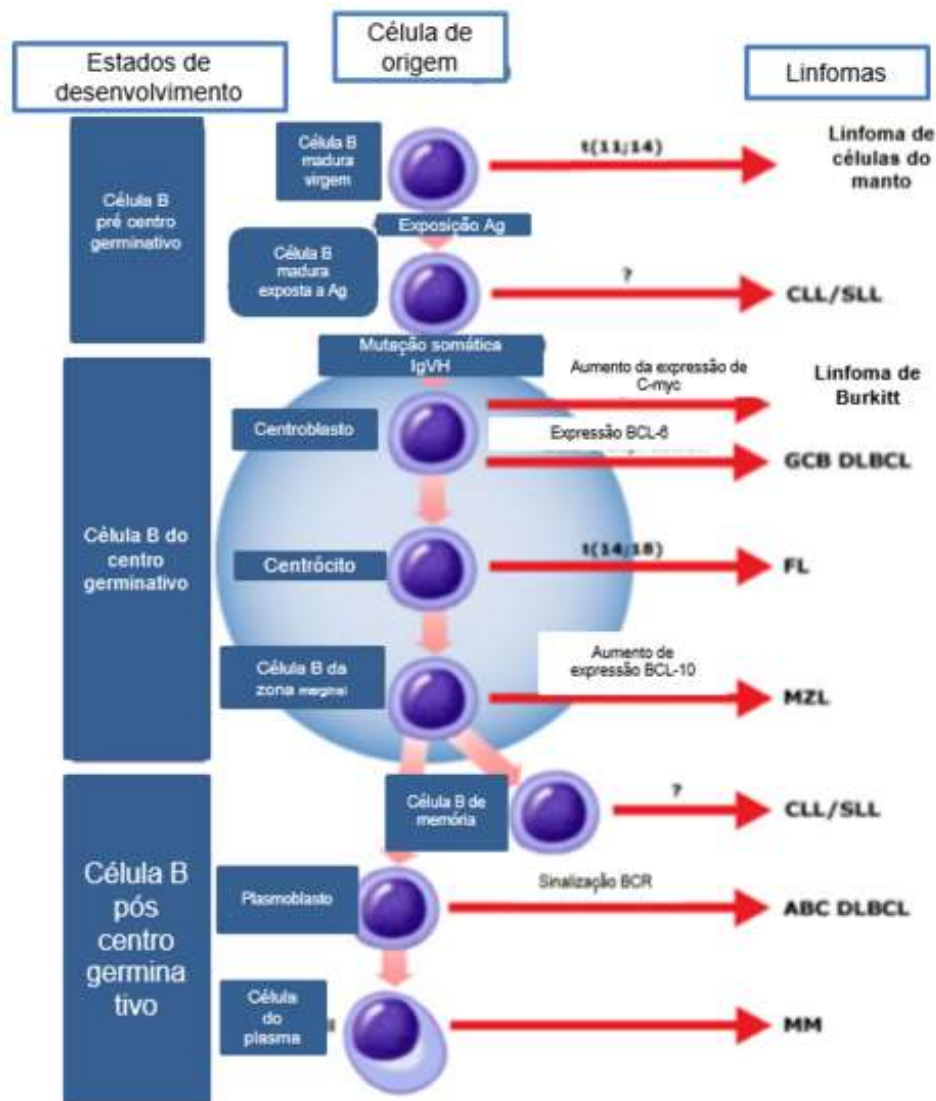


Figura 1--Linfomas não Hodgkin em diferentes fases do desenvolvimento de células B (adaptado de Guerard & Bishop, 2012)

A translocação t (11;14), por sua vez, justapõe o gene CCND1 do cromossoma 11 no locus IgH do cromossoma 14, o que resulta numa sobre- expressão da ciclina D1. Tal pode ser observado no linfoma de células do manto (Georg Lenz, M.D., and Louis M. Staudt, M.D., 2010).

As sequências do gene BCL6, um factor de transcrição, são também alvo de hipermutações somáticas que provocam uma desregulação na expressão deste gene. Estas mutações estão presentes em cerca de 50% dos casos de DLBCL e reflectem o papel deste mecanismo no desenvolvimento dos linfomas (Basso & Dalla-Favera, 2012).

A activação NF- κ B por várias mutações é uma das alterações mais importantes no desenvolvimento das células B. Esta é, normalmente, feita através de vários receptores presentes nas células B (BCR, BAFF, receptores tipo-Toll). A presença de mutações que levam a uma activação constitutiva da via NF- κ B verifica-se em muitos NHL (Suarez & Lecuit, 2015).

Os linfomas surgem, então, em diferentes fases do desenvolvimento de linfócitos B podendo-se distinguir entre pré e pós- germinais.

2.1.2.Linfomas de células T e NK

Os linfócitos T derivam de um precursor da medula óssea que sofre maturação no timo. Neste local os linfócitos sofrem um processo de selecção positiva de acordo com a estrutura do TCR (T- cell receptor), diferenciando-se em linfócitos T maduros CD4+ ou CD8+. As células T podem então ser distinguidas em duas classes, de acordo com a estrutura do seu receptor: $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$. As células T $\alpha\beta$ abandonam o timo e podem, após exposição ao antigénio, tornar-se células de memória (Swerdlow et al., 2008).

As células NK partilham muitas das características das células T e distinguem-se destas pelo facto de não exprimirem o complexo completo do receptor T (Figura 2). Os mecanismos moleculares de patogénese destas células são ainda desconhecidos e são raras as translocações que activam oncogenes específicos, com excepção da t (2;5) que envolve ALK (cinase do linfoma anaplásico), envolvida no linfoma anaplásico de grandes células (Swerdlow et al., 2008).

A biologia do desenvolvimento de linfoma periférico de células T não é tão compreendida e a maioria dos subtipos não estão associados a alterações genéticas ou biológicas distintas (Shankland, Armitage, & Hancock, 2012).

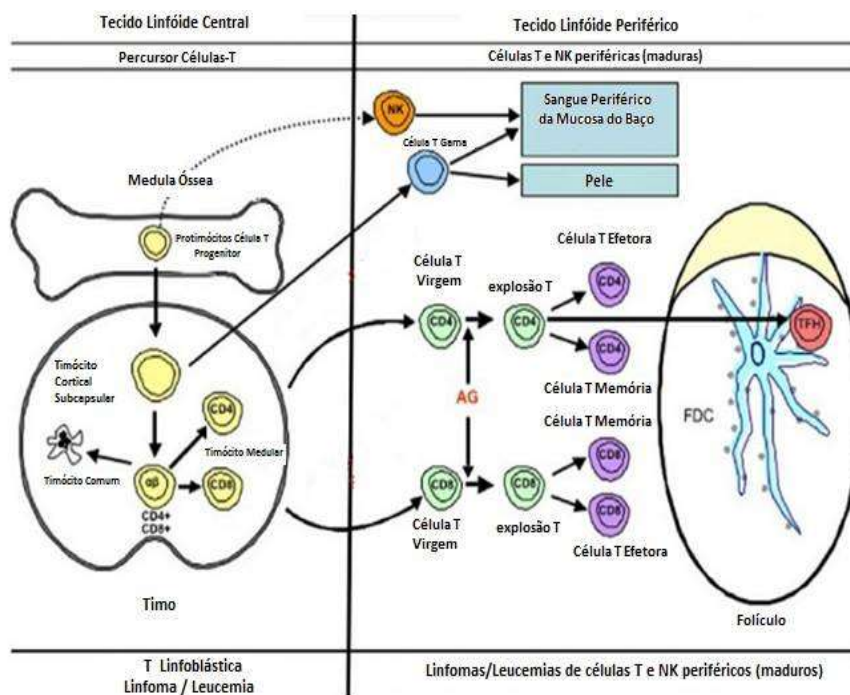


Figura 2-Desenvolvimento de células T (adaptado de Swerdlow et al., 2008).

2.2.Linfomas de Hodgkin

Com base nas suas características histológicas e morfológicas e de acordo com o fenótipo das células tumorais, os linfomas de Hodgkin subdividem-se em duas classes: linfoma de Hodgkin clássico e linfoma de Hodgkin com predomínio linfocitário nodular (NLPHL). Dentro do linfoma de Hodgkin clássico distinguem-se ainda 4 subtipos: esclerose nodular, celularidade mista, depleção linfocitária e rico em linfócitos (Mani & Jaffe, 2009).

Caracteriza-se pela presença de células mononucleadas, as células de Hodgkin e células multinucleadas, células de Reed–Sternberg, designadas no seu conjunto por células HRS. As células presentes no NLPHL são uma variante destas células e são chamadas de células LP (células predominantemente linfocitárias) (Swerdlow, 2008).

Tanto as células HRS como as LP têm origem em células B. As primeiras expressam marcadores das células B, nomeadamente o factor de transcrição BCL-6 e a enzima AID envolvida nos processos de hipermutação e mudança de classe das imunoglobulinas. Em relação às células HRS foi demonstrada a presença de mutações e rearranjos nos genes Ig V que são características das células B. Uma das hipóteses apresentadas para justificar a presença das mesmas é que as células HRS derivam de células B do centro germinativo que adquiriram mutações no gene da imunoglobulina V, evitando apoptose (Küppers, Engert, & Hansmann, 2012).

3.Epidemiologia

3.1.Linfoma não Hodgkin

Os NHL representam cerca de 5% dos novos câncros diagnosticados nos Estados Unidos da América, ocupando o sexto lugar dos câncros mais diagnosticados, e em 2015 estima-se que sejam diagnosticados 71850 novos casos (American Cancer Society, 2015).

Entre 1970 e 1990 verificou-se um aumento da sua incidência em vários países desenvolvidos. Este aumento é, em grande parte, atribuído à melhoria das técnicas de diagnóstico (Roman & Smith, 2011).

Aproximadamente 85% a 90% dos linfomas derivam de células B, surgindo os restantes de células T ou NK. Os dois tipos de NHL mais comuns são o linfoma folicular (35%) e o DLBCL (20%) (Figura 3) (Swerdlow et al., 2008).

Os padrões de ocorrência, juntamente com intensivas investigações nas duas últimas décadas, sugerem, fortemente, o papel dos efeitos ambientais e considerável variação etiológica nos diferentes subtipos de NHL (Chiu & Hou, 2015).

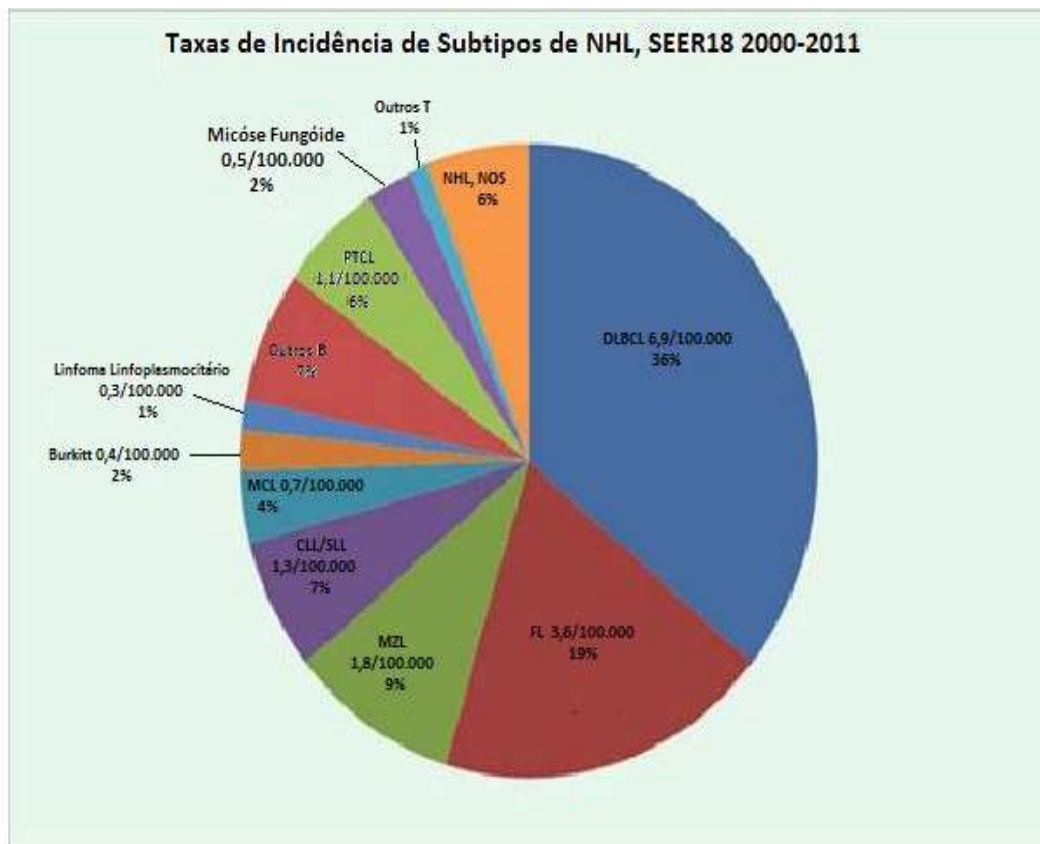


Figura 3-Taxas de incidência dos subtipos de NHL (Chiu & Hou, 2015)

A incidência anual, entre 2007 e 2010, foi de 19,7 casos por 100 000 pessoas, aumentando exponencialmente com a idade e é cerca de 50% superior nos homens, nos Estados Unidos da América. Verifica-se também que esta varia com a raça/etnicidade, com brancos não hispânicos a apresentar um maior risco do que indivíduos de raça negra. A incidência dos diferentes subtipos de NHL varia também por todo o mundo, sendo mais comum nos países desenvolvidos, com a Europa apresentar uma das taxas mais elevadas, a seguir aos Estados Unidos da América e Austrália. A Ásia, por sua vez, apresenta taxas de incidência menores. Em relação aos diferentes subtipos, a incidência de linfomas de células T/NK, linfoma de células B da zona marginal e linfoma MALT tende a ser superior nos países Asiáticos. Em contraste, as taxas de linfoma folicular e CLL/SLL são menores nestes países. Esta heterogeneidade geográfica, étnica e racial sugere que factores ambientais, infecciosos e os diferentes estilos de vida influenciam a etiologia dos vários subtipos de NHL (Chiu & Hou, 2015).

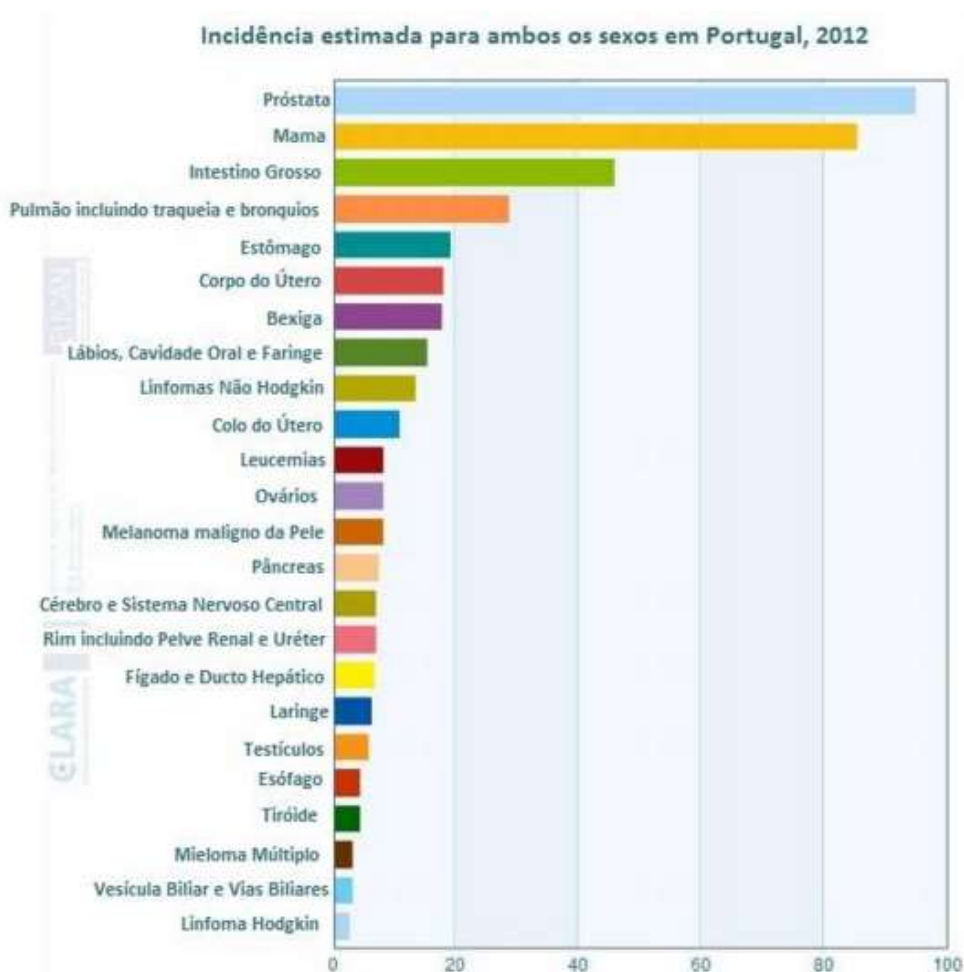


Figura 4-Taxa de incidência estimada para ambos os sexos em Portugal em 2012 de acordo com o European Cancer Observatory disponível em <http://eco.iarc.fr/EUCAN/Country.aspx?ISOCountryCd=620>

Em 2012 cerca de 49533 novos casos de linfoma não Hodgkin tinham sido detectados na Europa. Em Portugal verificou-se uma incidência, em 2012, de 13,4 novos casos por 100 000 indivíduos (em ambos os sexos), ocupando o 9º lugar na tabela dos cancros com maior incidência. (Figura 4) (European Cancer Observatory, 2012).

3.2.Linfoma de Hodgkin

O linfoma de Hodgkin apresenta uma incidência relativamente baixa, com uma pequena superioridade no sexo masculino. As taxas de incidência estimadas em todo o mundo, em 2012, foram de 1,1 por cada 100 000, para o sexo masculino e 0,7 para o sexo feminino. A sua incidência varia entre os diferentes países, e é superior nos países mais desenvolvidos (Engert & Younes, 2015).

Estima-se que em 2015 sejam diagnosticados cerca de 9050 novos casos nos Estados Unidos (American Cancer Society, 2015).

A variação na incidência ocorre também entre diferentes raças e etnicidades. Em Inglaterra verificou-se uma maior taxa de incidência em Sul Asiáticos, entre 2001 e 2007, enquanto nos Estados Unidos (entre 2001 e 2006) a maior incidência se verificou em brancos não-hispânicos, seguindo-se os indivíduos de raça negra e hispânicos. Ainda nos Estados Unidos, verificou-se um aumento anual das taxas de HL em Asiáticos, entre 1992 e 2010. Neste mesmo período, semelhante aumento, embora maior, ocorreu no Japão o que sugere uma influência adicional das populações relativamente homogêneas na ocorrência desta doença (Engert & Younes, 2015).

Verificam-se também maiores picos de incidência em jovens adultos e em indivíduos com idades a partir dos 60 anos, sendo raro em crianças menores de cinco anos (K. J. Marcus & Tishler, 2010).

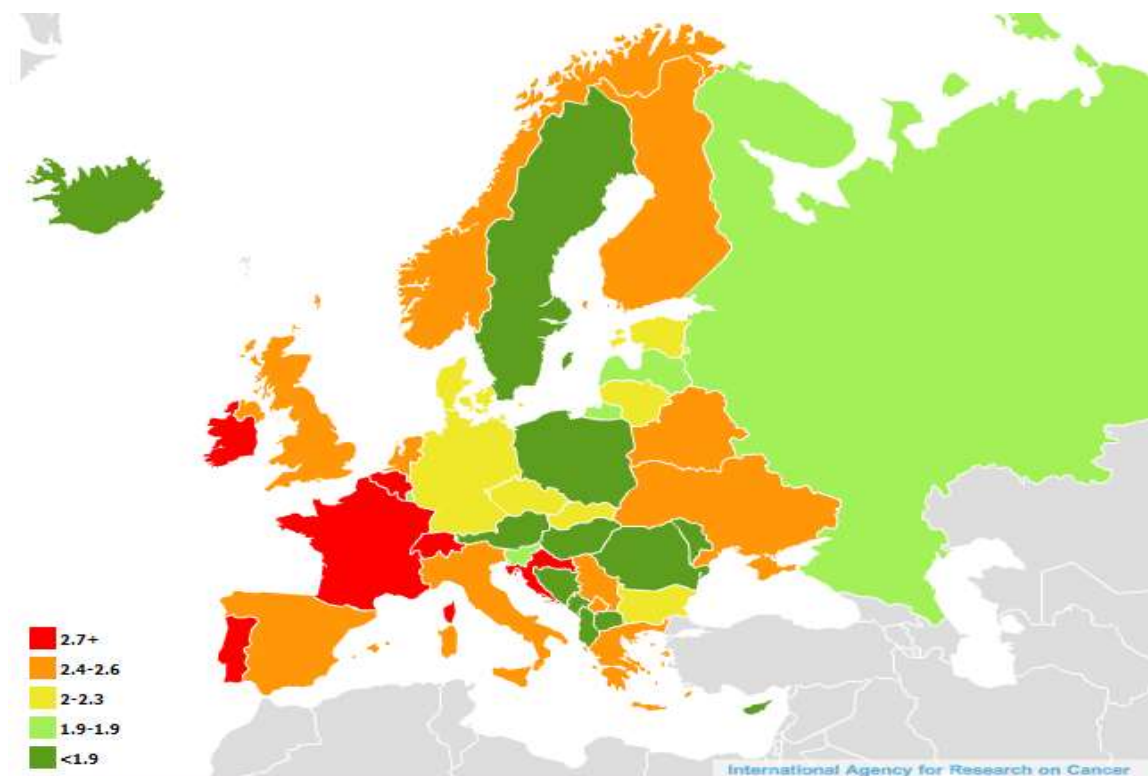


Figura 5-Incidência estimada do Linfoma de Hodgkin para ambos os sexos em 2012 na Europa de acordo com o European Cancer Observatory, disponível em <http://eco.iarc.fr/EUCAN/Cancer.aspx?Cancer=37>

A incidência estimada, no ano de 2012, do linfoma de Hodgkin foi de 2,5 na Europa e de 2,7 em Portugal, por 100 000 indivíduos (Figura 5) (European Cancer Observatory, 2012).

É possível, então, constatar que o NHL continua a afectar um maior número de indivíduos em comparação com o HL.

4.Diagnóstico e Tratamento

4.1.Diagnóstico

O diagnóstico é feito a partir de uma excisão do tecido tumoral, através de uma biópsia. Posteriormente é feita uma avaliação histopatológica tendo como suporte um conjunto de dados clínicos, histológicos e imunofenotípicos à qual se segue a sua posterior classificação (Eichenauer et al., 2014; Guerard & Bishop, 2012).

O perfil imunohistoquímico varia para os diferentes tipos de linfoma:

- As células tumorais de DLBCL expressam CD20, CD79a, BCL6, CD10, MYC, BCL2, Ki67, IRF4, CyclinD1, CD5 e CD23 (Tilly et al., 2015).
- Para o Linfoma Folicular as células são positivas para a cadeia leve de imunoglobulina, CD19, CD20, CD10, e BCL-6 e não expressam CD5 e CD23 Além disso quase todas as células apresentam uma expressão aumentada de BCL2 (Freedman, 2014).
- As células de SLL expressam os antigénios CD15, CD19, CD20 e CD23.A distinção entre as células tumorais do MCL e as de SLL é baseada no facto de as primeiras serem habitualmente negativas para CD23. No caso de estas expressarem CD23, os métodos de coloração imuno-histoquímica para detecção da ciclina D1 e SOX11 ou método de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), para detectar a translocação t(11;14) permitem estabelecer um diagnóstico diferencial de MCL (Eichhorst et al., 2015).
- No caso do HL clássico, as células HRS expressam CD30 e CD15 e, ocasionalmente, CD20, sendo negativas para CD45. Em relação ao NLPHL as células LP expressam CD20 e CD45 e não expressam CD15 e CD30 (D. A. Eichenauer et al., 2014).

4.2. Avaliação da extensão

O estágio da doença é determinado com recurso ao sistema de Ann Arbor (Tabela 2) inicialmente implementada em relação ao linfoma de Hodgkin, em 1971 (Shankland et al., 2012).

A citografia computadorizada (CT) com contraste, a MRI e os raios X são exames que auxiliam no estadiamento dos linfomas, sendo que a MRI detecta melhor a presença de doenças nos ossos e no sistema nervoso central. A topografia com emissão de positrões, em associação com um análogo da glucose, a *fluorodeoxyglucose* (18F) (FDG-PET) tem vindo a ser cada vez mais utilizada, provando ser, também, um método capaz de oferecer informação adicional, tanto numa fase inicial de pré-tratamento como de manutenção. Devido à sua alta sensibilidade, no caso dos linfomas de Hodgkin, não é necessário recorrer a uma biópsia da medula óssea se estiver disponível a avaliação PET/CT. De referir ainda que o uso de PET para diagnóstico da doença pode levar a uma classificação superior à real, pelo que este método é mais utilizado no estadiamento, avaliações de resposta à terapêutica, vigilância, acompanhamento e no fim de tratamento (D. A. Eichenauer et al., 2014; Shankland et al., 2012).

O Índice de Prognóstico Internacional (IPI) é o modelo mais utilizado na avaliação do prognóstico de doentes com linfoma não Hodgkin e contabiliza factores de risco como : idade (< ou > de 60 anos), concentração de lactato desidrogenase (LDH), *performance status* de acordo com o Eastern Cooperative Oncology (<2 vs ≥2), estágio de Arbor (I/II vs III/IV), e número de locais extranodais implicados (≤1 vs >1). Para o prognóstico do linfoma folicular, especificamente, foi validado o FLIPI (Índice de Prognóstico Internacional para o Linfoma Folicular) (Solal-Celigny, 2004).

No caso do linfoma de Hodgkin no estágio avançado é utilizado o Índice de Prognóstico Internacional de Hasenclever para prever o prognóstico. O cálculo tem em conta 7 factores clínicos e laboratoriais: idade, sexo, concentração de albumina (<40 g/L), concentração hemoglobina (<105 g/L), doença no estágio IV, leucocitose (≥15×10⁹ leucócitos/ L) e linfopenia (<0,6×10⁹ linfócitos/L, ou <8% da contagem total de leucócitos). A presença de um dos factores reduz em cerca 8% a sobrevivência de 5 anos (Townsend & Linch, 2012).

Tabela 2- Classificação de Ann Arbour (adaptado de Shankland et al., 2012)

Estádio	Definição
I	Envolvimento de 1 nódulo linfático ou de estrutura linfóide
II	Envolvimento de 2 ou mais regiões linfonodais do mesmo lado do diafragma ou comprometimento localizado de um órgão ou sítio extranodal
II	Envolvimento de regiões linfonodais do mesmo lado do diafragma que pode incluir o envolvimento localizado de um órgão extranodal, do baço ou ambos
IV	Envolvimento disseminado de um ou mais órgãos

Todos os estádios são ainda divididos com base na presença ou ausência de sintomas B: febre, perda inexplicável de 10% ou mais do peso e sudorese noturna (Shankland et al., 2012).

4.3.Tratamento de linfomas não Hodgkin

4.3.1.Linfomas de células B

Linfoma Difuso de grandes células B

As proteínas de superfície CD19, CD20, e CD22, são amplamente expressas nos linfomas de células B e representam potenciais alvos terapêuticos. Os resultados com maior impacto estão associados à proteína CD 20 que se pensa estar envolvida na regulação de cálcio intracelular, no ciclo celular e apoptose.(Dotan, Aggarwal, & Smith, 2010)

O rituximab é um anticorpo monoclonal anti CD-20 cuja adição ao regime de quimioterapia convencional demonstrou estar relacionada com melhores taxas de sobrevivência.(Michael Pfreundschuh et al., 2011; Sehn et al., 2005)

Deste modo, as guidelines europeias sugerem como tratamento de primeira linha um regime de quimioterapia contendo cilofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona adicionado de rituximab. (R-CHOP). (Tilly et al., 2015)

Em casos de recidiva, os estudos indicam que os regimes de salvamento mais aplicados, R-ICE (rituximab, ifosfamida, carboplatina ,etoposito) e R-DHAP(rituximab, dexametasona, citarabina em dose elveada, cisplatina) proporcionam resultados semelhantes. Para os doentes que respondam à terapia de salvamento seguem-se regimes de quimioterapia com doses elevadas e transplante de células estaminais autólogas (ASCT). Nestes casos, a adição de rituximab à terapêutica não demonstrou benefícios, pelo contrário, nos pacientes que receberam rituximab observou-se um aumento da toxicidade, provavelmente devido a um estado imunitário debilitado, após o transplante (Gisselbrecht et al., 2010).

De referir que a actividade do Rituximab em monoterapia no DLBCL é limitada. A sua função está sobretudo relacionada com a sensibilização do linfoma à quimioterapia. (Gisselbrecht et al., 2012).

Linfoma Folicular

Este tipo de linfoma ocupa a 2ª posição dos linfomas mais comuns nos Estados Unidos e na Europa Ocidental. A WHO classifica o linfoma folicular em 3 graus, de acordo com a proporção de centroblastos presentes, onde os graus 1 e 2 se referem a casos com poucos centroblastos, ou seja, linfomas indolentes (Swerdlow et al., 2008).

A opção de tratamento não é consensual e varia entre os oncologistas, optando alguns por tratar o linfoma de grau 3 com um regime de R-CHOP, enquanto outros acreditam que a terapêutica deve ser a mesma, independentemente do grau (Shankland et al., 2012).

Não existem evidências de que o tratamento em doentes assintomáticos aumenta as hipóteses de sobrevivência. Deste modo ainda existe controvérsia sobre a altura indicada para se iniciar o tratamento (Ardeshna et al., 2003).

Quando a doença se encontra em estágio limitado (estádio I e II) a radiação é a terapêutica de eleição, com uma taxa de sobrevivência de cerca de 10 anos, em 60% a 80% dos indivíduos. Caso a radiação não seja uma escolha viável, graças aos seus efeitos adversos, aconselha-se apenas uma postura de observação nos casos assintomáticos e a monoterapia com Rituximab na presença de sintomas (Dreyling et al., 2014; Guerard & Bishop, 2012).

Existem várias opções terapêuticas para o estado avançado deste linfoma. Os regimes terapêuticos incluem clorambucilo, fludarabina, ou bendamustina, podem consistir numa

combinação de ciclofosfamida, vincristina, e prednisolona ou ainda regimes contendo antraciclinas, apesar das evidências do seu valor acrescido em relação a outros regimes serem limitadas (Dreyling et al., 2014; Itchaki et al., 2013).

O efeito do rituximab no aumento da sobrevida livre de progressão foi demonstrado em vários estudos, pelo que este deve ser incluído no tratamento inicial de todos os doentes com linfoma em estado avançado (Hiddemann et al., 2005; R. Marcus et al., 2008), assim como na terapêutica de manutenção, pois prolonga a duração da remissão (Fowler, 2011).

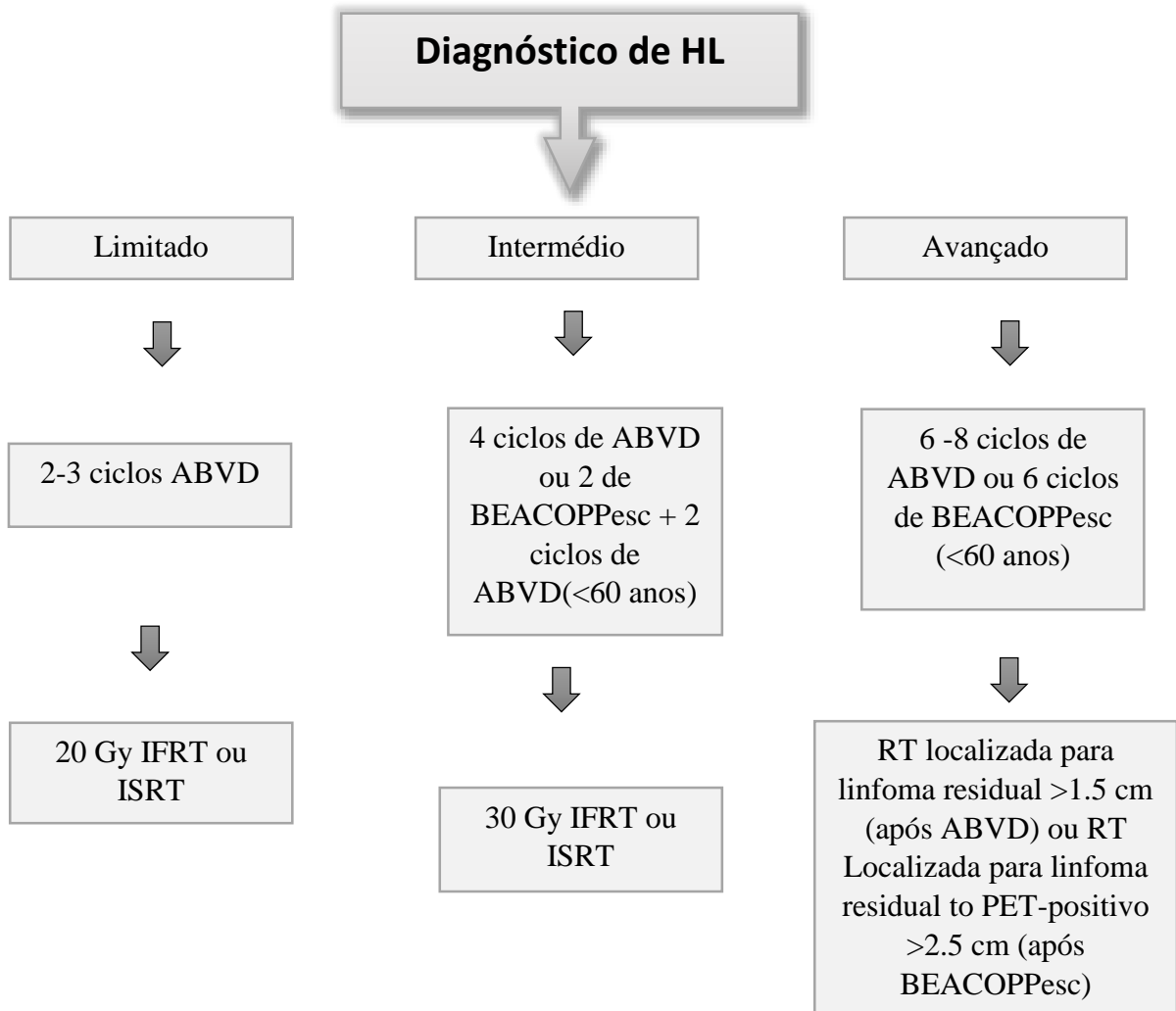
4.3.2. Linfomas de células T

O tratamento consiste em sessões de quimioterapia com associações de fármacos para os linfomas periféricos (Shankland et al., 2012)

Foi aprovado, para o tratamento do linfoma anaplástico, pela FDA, o conjugado de brentuximab e vedotin, combinando assim um anticorpo monoclonal anti-CD 30 (brentuximab) e um agente antitubolínico, a monomethylauristatina E (vedotin) (Savage et al., 2008)

4.4. Tratamento do Linfoma de Hodgkin

Algoritmo para o tratamento de HL, adaptado de D.A. Eichenauer et al. (2014).



As guidelines europeias recomendam, em casos de recidiva, ciclos quimioterapêuticos de altas doses seguidos de transplante autólogo de células estaminais. Os vários regimes possíveis incluem: DHAP (dexametasona, Ara-C em dose elevada, cisplatina) ou IGEV (ifosfamida, gemcitabina, vinorelbina) ou ICE (ifosfamida, carboplatina, etoposido) que reduzem a carga tumoral e mobilizam as células estaminais antes da quimioterapia de dose elevada e do transplante autólogo de células estaminais. Quando estas opções não são aplicáveis, é utilizado o conjugado brentuximab vedotin (D. A. Eichenauer et al., 2014; Gopal et al., 2012).

5.Farmacogenética

Usado pela primeira vez por Voguel, em 1959, o termo farmacogenética refere-se ao estudo da influência da variabilidade genética na resposta terapêutica, nomeadamente dos efeitos adversos e eficácia (Motulsky & Qi, 2006).

Muitas vezes dá-se uma sobreposição dos termos farmacogenética e farmacogenómica, sendo este último visto como a convergência do estudo de todos os genes do genoma aplicado à farmacogenética. A sua distinção é arbitrária sendo estes utilizados como sinónimos (Pirmohamed, 2001).

Apesar da importância de factores como a idade, sexo, função renal e hepática, doenças concomitantes e interacção com outros fármacos reconhece-se actualmente que diferenças no metabolismo dos fármacos herdadas pelos indivíduos, assim como polimorfismos genéticos presentes nos alvos terapêuticos podem influenciar significativamente a resposta do indivíduo à terapêutica. Estas diferenças genéticas podem afectar tanto a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos) como a farmacodinâmica (por exemplo as interacções com os alvos terapêuticos, com os receptores e com enzimas) (Evans & Relling, 1999). Esta variabilidade genética representa cerca de 15% a 30% das diferenças no metabolismo e eficácia dos fármacos nos diferentes indivíduos e, em alguns fármacos, pode mesmo chegar aos 95% (Eichelbaum, Ingelman-Sundberg, & Evans, 2006).

A variabilidade genética pode ser causada por polimorfismos genéticos que consistem em alterações na sequência do DNA como deleções, substituições, inserções, repetições, variação do número de cópias e outros rearranjos. Estas alterações podem levar a uma modificação na expressão destes genes (Robert, Le Morvan, Giovannetti, & Peters, 2014).

Assim, a utilização de doses equivalentes em indivíduos diferentes, em quimioterapia, pode provocar diferentes respostas ao tratamento. Os polimorfismos genéticos, em genes que codificam para enzimas de metabolização, proteínas de transporte, alvos terapêuticos e outros genes que influenciam a resposta à terapêutica são, em grande parte, responsáveis por esta variabilidade e eficácia do tratamento (Deenen, Cats, Beijnen, & Schellens, 2011).

O objectivo das disciplinas emergentes da farmacogenética e farmacogenómica é o tratamento personalizado, com base no genótipo do indivíduo. Deste modo, a

informação genética tem sido utilizada na identificação do risco da doença (por exemplo a avaliação da mutação de BRCA1 para avaliar o risco de cancro da mama), na escolha dos agentes de tratamento (por exemplo, a CYP2D6 no tratamento do cancro da mama) e na decisão da dosagem (por exemplo, CYP2C9 e VKORC1 para a dosagem de varfarina , UGT1A1 para irinotecano, e TPMT para 6-mercaptopurina e azatioprina) (R. S. Huang & Ratain, 2009).

A farmacogenética dos agentes anticancerígenos é das áreas mais estudadas graças à estreita margem terapêutica dos mesmos que possuem toxicidades mais severas que outros fármacos e que podem ser fatais (Weng et al., 2013).

O projecto da sequenciação do genoma humano foi um importante passo para a investigação nesta área. Uma das suas maiores descobertas foi que, apesar do genoma humano ser cerca 99,9% idêntico em todos os indivíduos, a mudança de um só nucleótido, os designados *single nucleotide polymorphisms* (SNP), parece conter importantes pistas para as diferenças individuais na susceptibilidade a doenças (Chial, 2008).

A sua frequência alélica é de pelo menos 1% , ocorrendo 1 a cada 1000pb. Cerca de 10 milhões de SNPs estão registados na base de dados do NCBI. No entanto, a grande maioria correspondem a SNPs situados em regiões não codificantes. Quando ocorrem em regiões codificantes, estes podem provocar alterações na sequência proteica e em regiões não codificantes podem causar diferenças na quantidade de proteína traduzida, o que se pode traduzir em alterações fenotípicas. Apesar disso, a maioria dos polimorfismos que se encontram em regiões não condificantes não produzem sequências, sendo utilizados como marcadores (Robert et al., 2014; Shen, Tian, Ran, & Gao, 2015).

Cada indivíduo possui duas cópias de cada gene, uma em cada cromossoma. Contudo, a análise do genoma humano, integrada no projecto The Human Genome Project, detectou a presença de regiões genéticas cujo número de cópias era diferente entre indivíduos. Estas variações genéticas designam-se CNVs (variação do número de cópias) e, apesar da discordância em volta do seu papel na patogénese de várias doenças, existem evidências desse papel na eficácia e toxicidade de alguns fármacos (Y. He, Hoskins, & McLeod, 2011).

Os avanços no conhecimento do genoma humano abrem então as portas para a medicina personalizada que constitui o grande objectivo da farmacogenética. Apesar da diferença entre indivíduos se dever também a outros factores são já muitas as evidências de que os factores genéticos são importantes na variação da ocorrência de reacções adversas e na eficácia dos fármacos (Weinshilboum & Wang, 2006).

5.1. Polimorfismos genéticos em genes que codificam de enzimas de metabolização

Os processos metabólicos convertem os fármacos em metabolitos mais solúveis em água, logo mais facilmente excretados. Estas reacções, catalisadas por enzimas, dividem-se em reacções de fase I e reacções da fase II. Na fase I ocorrem reacções de oxidação, redução e hidrólise e na fase II o fármaco ou o metabolito resultante da fase I é ligado covalentemente a um substrato endógeno solúvel em água como, por exemplo, ácido glucurónico ou glutatona. Os avanços na área da farmacogenética permitiram identificar vários polimorfismos que afectam a actividade destas enzimas e o seu impacto nas diferentes respostas aos tratamentos entre indivíduos (Serpe, Canaparo, Scordo, & Spina, 2015).

5.2. Enzimas de fase I

A grande maioria dos fármacos sofre metabolização pelas enzimas do citocromo P-450 (CYP) que são responsáveis pelas reacções de oxidação da fase I. Estão presentes no genoma humano 57 genes CYP agrupadas em 18 famílias e 44 subfamílias. Contudo, apenas cerca de uma dúzia de enzimas das famílias 1, 2 e 3 estão envolvidas nas reacções de metabolização da fase I (Serpe et al., 2015).

De entre as enzimas CYP450 envolvidas no metabolismo de fármacos anticancerígenos foram identificados polimorfismos genéticos nas isoformas *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, e *CYP3A5* (Deenen et al., 2011).

A *CYP2B6* é responsável pela metabolização 20% a 25% dos fármacos comercializados e a mais estudada (Ma & Lu, 2011). Cerca de 100 SNPs estão já identificados para esta enzima tendo os mesmos sido implicados na eficácia da terapêutica dos linfomas com ciclofosfamida, uma vez que este fármaco sofre activação por esta enzima (G. G. Johnson et al., 2013).

Outro estudo sugere que a enzima *CYP2E1* possa influenciar o metabolismo de fármacos utilizados no tratamento SLL, como Fludarabina, Rituximab, Ciclofosfamida, Alemtuzumab, Bendamustina, Clorambucil (Han et al., 2010).

Por sua vez, uma elevada expressão da *CYP3A4*, uma enzima expressa nos tumores de células T, revelou uma diminuída resposta à quimioterapia. Desta forma, doentes com elevada expressão desta enzima, provavelmente, beneficiariam de um

regime de quimioterapia alternativo, com um fármaco cuja inactivação não dependesse desta enzima (Rodri et al., 2007).

Outro exemplo é um estudo envolvendo a população da Arábia Saudita onde se observou que doentes com o alelo CYP1A1*2C tinham um maior risco de desenvolver DLBCL. Esta associação poderá estar relacionada com o papel desta enzima no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos (Al-Dayel et al., 2008).

5.3. Enzimas de fase II

Algumas das famílias de enzimas envolvidas nas reacções de metabolização da fase II são a uridina difosfato glicoronosilttransferases (UGTs), N-acteiltransferases (NATs), tiopurina S-metiltransferase (TPMT), sulfotranferases (SULTs) e glutathione S-transferases (GSTs). Estas enzimas, para além de produzirem metabolitos mais facilmente excretados, também possuem um papel importante na minimização da toxicidade dos metabolitos tóxicos provenientes das reacções de fase I, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Neste sentido, existem estudos que associam a presença de polimorfismos nos genes que codificam estas enzimas com a incidência de algumas doenças (Ekhart, Rodenhuis, Smits, Beijnen, & Huitema, 2009).

Em relação à família das GSTs destacam-se os genes que codificam para as enzimas GSTA, GSTP, GSTT e GSTM. Polimorfismos nestes genes podem afectar a função enzimática das mesmas e, conseqüentemente, o risco e a eficácia no tratamento de vários cancros, nomeadamente do HL. A explicação parece estar no facto destas enzimas se encontrarem envolvidas na metabolização de agentes alquilantes, antraciclina e ciclofosfamida, fármacos utilizados no tratamento do cancro e, portanto, uma variação genética pode alterar a capacidade de metabolização destas enzimas e, conseqüente, a excreção de carcinogéneos e fármacos antineoplásicos (Altés et al., 2013; Ekhart et al., 2009).

Exemplos destes polimorfismos são deleções homozigóticas nos genes GSTT1 e GSTM1 e ainda um SNP no gene GSTP1 que leva a uma substituição, no codão 105, do aminoácido isoleucina para valina (Ile105Val), causando uma diminuição da sua actividade. Indivíduos com estes polimorfismos demonstraram um risco aumentado de HL e pior prognóstico (Yri et al., 2012).

Outro estudo verificou também a existência de uma associação entre deleções nos genes GSTM1 e GSTT1 e a toxicidade resultante do regime de quimioterapia padrão para

o tratamento de linfomas, o R-CHOP. Doentes homozigóticos para a deleção do gene GSTT1 sofreram maior toxicidade do que os outros pacientes. Essa toxicidade foi, ainda, superior em pacientes com dupla deleção GSTM1/GSTT1. Deste modo, os polimorfismos descritos podem servir como marcadores de prognóstico e podem auxiliar na previsão da eficácia e toxicidade do tratamento (Y. He et al., 2011).

Efeitos semelhantes foram descritos para a subclasse de enzimas UGT1A1 (Ribrag et al., 2009).

5.4. Proteínas de transporte

As proteínas de transporte desempenham um papel crucial na destoxificação do organismo ao controlar o efluxo de substâncias endógenas, reduzindo a entrada de substâncias nocivas e tóxicas e aumentando a sua excreção, influenciando, assim, a farmacocinética dos fármacos (Figura 6) (Campa et al., 2012). O interesse nestas proteínas tem vindo a aumentar nas várias áreas terapêuticas devido ao seu papel na regulação da absorção, distribuição e eliminação de fármacos e no desenvolvimento de resistências aos fármacos, por diminuição da sua captação ou aumento do efluxo. Existem duas superfamílias de proteínas transportadoras que medeiam o transporte de citotóxicos. A família ABC (ATP-binding cassette) e a SLC (solute carriers).

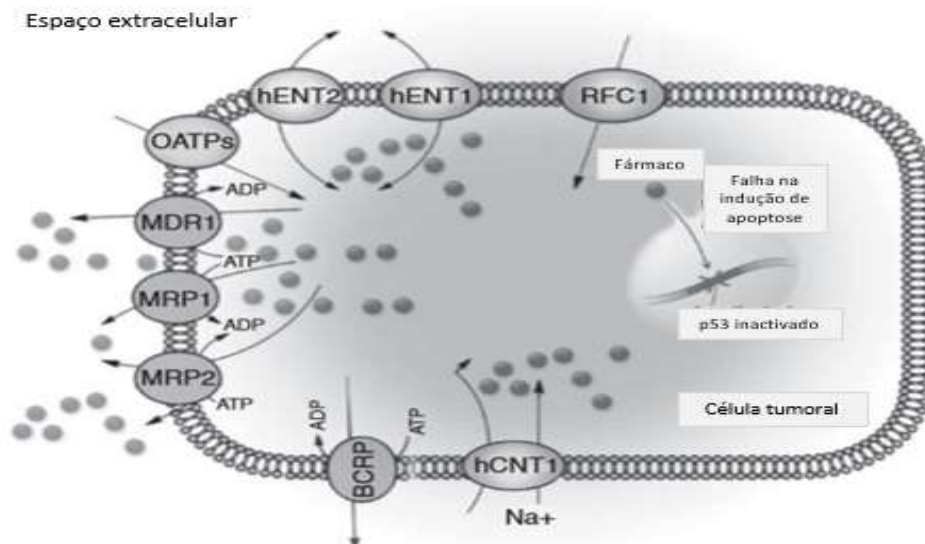


Figura 7-Proteínas de transporte e mecanismos de resistência presentes nas células cancerígena (adaptado de Joyce et. al., 2015)

Grande parte dos agentes anticancerígenos são substratos para estas duas famílias de proteínas transportadoras (Tabela 3). Juntas, controlam o influxo e efluxo destes fármacos, modulando a sua concentração dentro das células, desempenhando, assim, um

papel na eficácia terapêutica, progressão da doença recidiva, ou seja, na eficácia ou falha do tratamento (Figura 6) (Joyce, McCann, Clynes, & Larkin, 2015).

Dentro da família ABC destacam-se três subfamílias pela sua importância no tratamento do cancro, a ABCB1/MDR1, a ABCC2/MRP2 e ABCG2/BCRP2. Existem evidências de que uma expressão aumentada destas proteínas está relacionada com uma acumulação reduzida de fármacos anticancerígenos no interior das células e com a resistência de células cancerígenas a múltiplos fármacos (Y.-L. Sun, Patel, Kumar, & Chen, 2012).

Por exemplo, o gene MDR1 codifica para a P-glicoproteína (P-gp), que bombeia fármacos anticancerígenos como alcalóides da vinca (por ex.: vinblastina e vincristina) e antraciclina (por ex.: doxorrubicina), que são utilizados no tratamento dos linfomas de Hodgkin e não Hodgkin. Vários SNPs no gene MDR1 alteram a expressão e função desta proteína (Shukla, Ohnuma, & Ambudkar, 2011). Dos mais de 50 SNPs já identificados para este gene os que ocorrem com mais frequência na população (10%) são: 1236C> T (rs1128503, exon 12), 2677G> T/A (rs2032582, exon 21), e 3435C> T (rs1045642, exon 26) (Santo & Medeiros, 2013; Y. L. Sun, Patel, Kumar, & Chen, 2012).

Tabela 3 – Substratos anticancerígenos das proteínas transportadoras da família ABC adaptado de Joyce 2015

Gene	Outras designações	Substratos
ABCB1	MDR1, P-glicoproteína	Vinblastina, vincristina, daunorrubicina, doxorrubicina, etoposido, metotrexato
ABCC1	MRP1 (bomba GS-X)	Vinblastina, vincristina, daunorrubicina, doxorrubicina, etoposido, metotrexato, glutathione (GSH), conjugados glucuronídeos e de sulfato
ABCC2	MRP2, cMOAT	Vinblastina, vincristina, doxorrubicina, etoposido, metotrexato, glutathione, cisplatina, GSH
ABCG2	BCRP2- <i>Breast cancer resistance protein</i>	Daunorrubicina, doxorrubicina, etoposido, metotrexato, glutathione, conjugados de sulfato

A maioria dos transportadores da família SLC são transportadores activos secundários que utilizam o gradiente electroquímico como fonte de energia. Estes transportam substratos específicos como aminoácidos, oligopéptidos, fosfatos, nucleósidos, metais, vitaminas solúveis em água e estão ainda envolvidos na captação e

quimiosensibilidade de fármacos hidrofílicos. Os transportadores são assim responsáveis não só pelo transporte de nutrientes para as células, como também pela captação de agentes anticancerígenos (Joyce et al., 2015 ;Y. Huang & Sadée, 2006).

No caso da SLC22A16, uma proteína transportadora de catiões iónicos, foi demonstrado que esta transporta fármacos anticancerígenos como a doxorrubicina, um agente utilizado, por exemplo, em casos de DLBCL. A eficácia de alguns fármacos tem sido relacionada com o nível de actividade e expressão deste transportador em células tumorais mas o seu papel no DLBCL ainda não está esclarecido (Novak et al., 2015).

6.R-CHOP e o Linfoma difuso de grandes células B

O linfoma difuso de grandes células B é um dos subtipos de linfoma mais comuns no ocidente (Novak et al., 2015). O tratamento de 1ª linha consiste numa combinação de rituximab, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisolona (R-CHOP) (Tilly et al., 2015). Apesar da grande taxa de cura, a falta de remissão ou a recidiva em pouco tempo permanecem preocupantes. Vários são os factores já identificados que influenciam o sucesso da terapêutica como a idade, o sexo, a lactato desidrogenase e o estágio da doença. Contudo, existem ainda por identificar factores biológicos que podem auxiliar no reconhecimento de pacientes de alto risco e na possível intervenção terapêutica direccionada a estes factores. Assim, eventos genómicos podem ser a chave do sucesso terapêutico ao funcionarem como preditores da resposta (Novak et al., 2015).

Deste modo, serão aqui mencionados alguns dos polimorfismos cuja ocorrência parece ter impacto na resposta ao regime terapêutico supra mencionado e consequente progressão da doença.

Polimorfismos no gene MPO

Este gene codifica para a enzima mieloperoxidase MPO que catalisa várias reacções de oxidação para além de produzir potentes oxidantes e ácido hipocloroso. Uma diminuição na expressão desta enzima pode levar a níveis de oxidantes mais baixos, oxidantes estes que podem ser necessários para uma actividade plena dos agentes antineoplásicos (Gustafson et al., 2014).

O SNP rs2333227 (-463 G>A) localiza-se 463pb a montante do gene MPO. O alelo G actua como um local de ligação de factores de transcrição para a proteína estimulante SP1, reagindo assim com a SP1 e aumentando a expressão de MPO. Assim, a substituição G>A resulta na diminuição da expressão de MPO (Chu et al., 2010).

Recentemente, um estudo demonstrou que o raro genótipo homozigótico GG do SNP rs2243828 estava associado a menores valores de sobrevivência em doentes com DLBC após o tratamento com R-CHOP (Gustafson et al., 2014). Este SNP encontra-se a 122pb do rs2333227 e o alelo G do rs2243828 encontra-se em desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*) com o alelo A do rrs2333227. Deste modo, julga-se que o alelo

G do rs2243828 possa estar associado a uma menor expressão de MPO, o que pode ser benéfico à sobrevivência das células tumorais (Xu et al., 2014).

6.1.Doxorrubicina

Existem dois mecanismos propostos para a acção da doxorrubicina exercida na célula: intercalação no DNA, provocando disrupção da reparação do mesmo mediada pela topoisomerase II e geração de radicais livres que danificam as células tumorais (Thorn et al., 2011).

Outro processo alternativo é a entrada da doxorrubicina no núcleo, inibindo a topoisomerase II e danificando o DNA o que também irá causar morte celular. Neste caso, os genes envolvidos dizem respeito a enzimas que participam na reparação do DNA e controlo do ciclo celular. (TOP2A, MLH1, MSH2, TP53, e ERCC2) (Figura 7) (Thorn et al., 2011).

Os genes que podem estar envolvidos nos mecanismos de acção deste agente são genes capazes da reacção de redução (desidrogenases NADPH, sintetases de oxido nítrico e xantina-oxidase) bem como genes envolvidos na desactivação destes radicais livres (glutationa peroxidase, catalase e superóxido dismutase) (Thorn et al., 2011).

Este agente antineoplásico, apesar da sua grande eficácia em vários tumores, causa efeitos secundários cardiotoxicos que limitam a sua utilização (Zhao et al., 2010).

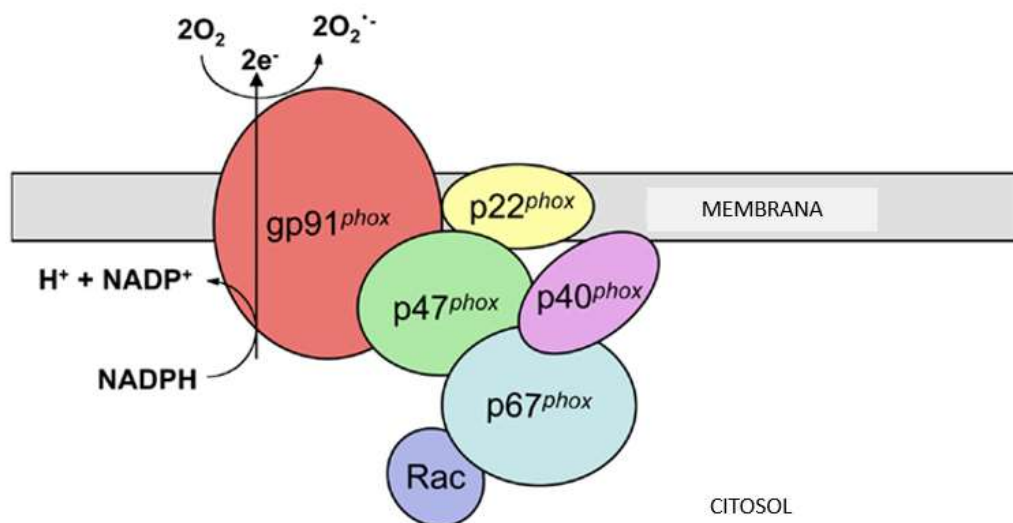


Figura 10-Estrutura do complexo enzimático NADPH (adaptado de Gardiner et al., 2013)

- Polimorfismos no gene CYBA

O CYBA, um gene que codifica a subunidade p22^{phox} do complexo NADPH oxidase pode ser afectado pelo polimorfismo não sinónimo CYBA rs4673 que provoca uma alteração na actividade da NADPH ao perturbar o local de ligação heme (Reichwagen et al., 2015). Doentes com o genótipo TT demonstraram pior sobrevivência livre de complicações (*EFS-event free survival*) quando comparados com os genótipos CC e CT. (Rossi et al., 2009). A investigação de Reichwagen et al. obteve resultados em conformidade com os supra mencionados. Os genótipos CT/TT de doentes com linfoma agressivo de células B, sujeitos a um regime de R-CHOP, demonstraram uma associação com cardiotoxicidade induzida por antraciclina (Reichwagen et al., 2015).

Estes resultados não são, contudo, concordantes entre todos os autores. A investigação de Cascales et al. revelou que o polimorfismo 242C>T da subunidade p22^{phox} (rs4673), que leva a uma substituição His72Tyr, tinha um papel protector contra a necrose miocárdica focal. Esta conclusão advém do facto de a frequência desta lesão ser superior em indivíduos com o genótipo CC, em contraste com a baixa frequência da mesma em indivíduos portadores do alelo T. Apesar destes resultados não estarem de acordo com os anteriores, eles são consistentes com os dados existentes que relacionam este polimorfismo com uma menor actividade da NADPH (Cascales et al., 2013).

Um estudo levado a cabo por Hoffman e seus colegas analisou outro polimorfismo neste gene e o conseqüente impacto da sua presença em doentes com linfoma não Hodgkin. O polimorfismo 640A> G na região 3' UTR demonstrou ter relevância clínica

com uma possível influência na funcionalidade desta enzima. A presença do alelo G estava associada a uma menor actividade enzimática e menores níveis de p22phox e mRNA de CYBA. Clinicamente, a presença deste alelo demonstrou ser desfavorável no prognóstico destes doentes, submetidos a um regime de CHOO ou CHOEP. Os mecanismos associados a este polimorfismo ainda não estão compreendidos mas, bioquimicamente, verificou-se que a sua presença estava associada a uma menor actividade de NADPH (Hoffmann et al., 2010).

- Polimorfismos no gene NCF4

NCF4 rs1883112 é um SNP do que codifica para a subunidade p40phox que regula a NADPH oxidase com potenciais consequências na sua expressão. Este estudo demonstrou que o mesmo tem um efeito protector em relação à toxicidade deste regime. Portadores do alelo G minor experienciaram menos frequentemente toxicidade hematológica, infecciosa e cardíaca. (Rossi et al., 2009). Dados semelhantes foram obtidos numa investigação levada a cabo por Gustafson que detectou uma associação entre este polimorfismo e melhores valores de sobrevivência livre de progressão (Gustafson et al., 2014)

O complexo NADPH gera espécies reactivas de oxigénio que podem induzir a apoptose ao interferir com as vias de sinalização para a sobrevivência redox - sensíveis ou através da formação de moléculas sinalizadoras da morte celular, através da oxidação de lípidos, proteínas ou DNA (Gustafson et al., 2014). Também Cascales et. al verificaram que o polimorfismo -212A>G da subunidade p40phox (rs1883112) estava fortemente associado à fibrose intersticial do miocárdio em doentes com cancro (a grande maioria com linfoma e leucemia), principalmente em indivíduos com o genótipo AA. O seu significado funcional não está ainda esclarecido mas sabe-se que o polimorfismo rs1883112 se localiza no promotor do gene *NCF4*, que está envolvido na regulação decrescente da NADPH (Cascales et al., 2013).

Além disso, outros estudos detectaram, igualmente, uma relação entre este polimorfismo e os efeitos adversos adjacentes ao tratamento de DLBCL, mais precisamente da doxorrubicina (Hoffmann et al., 2010; Wojnowski et al., 2005).

No entanto, recentemente, Reichwagen et. al não encontraram associações entre este polimorfismo e cardiotoxicidade induzida por antraciclinas (Reichwagen et al., 2015).

Polimorfismos no gene RAC2

A RAC2 é uma GTPase fundamental para a actividade da enzima NADPH. O SNP (7508T> A, rs13058338) encontrado no intrão 2 demonstrou estar associado à cardiotoxicidade aguda em doentes com NHL (a grande maioria dos quais com DLBCL) com idades entre os 18 e os 75 anos. Indivíduos portadores do alelo A exibiram predisposição para esta toxicidade induzida por antraciclina (Wojnowski et al., 2005).

Posteriormente, outro estudo em doentes com mais de 60 anos, diagnosticados com linfoma agressivo de células B, obteve os mesmos resultados. A associação entre a cardiotoxicidade e o genótipo homozigótico AA exibiu particular significância (Reichwagen et al., 2015).

Pressupõe-se que a RAC2 induz a NADPH através da activação de eventos das vias de sinalização. O alelo A, por sua vez, está relacionado com uma maior expressão em granulócitos, tanto de mRNA RAC2 como de NCF4, o que sugere o aumento da expressão e actividade deste complexo enzimático, nos portadores deste alelo A da RAC2. Contudo, esta hipótese não está ainda demonstrada em cardiomiócitos (Reichwagen et al., 2015).

Apesar das variantes genéticas não serem suficientemente específicas para o desenvolvimento de um regime terapêutico individualizado, baseado no genótipo, a identificação destas variantes permite a estratificação dos doentes em grupos de risco que podem eventualmente beneficiar da administração conjunta de um inibidor da NADPH. Ainda assim, mais estudos são ainda necessários a fim de perceber qual o papel da NADPH na toxicidade induzida por antraciclina (Reichwagen et al., 2015).

Não obstante dos resultados discordantes, é comum em todos os estudos que a actividade da NADPH oxidase tem uma íntima relação com a cardiotoxicidade induzida por antraciclina. O mecanismo exacto mantém-se ainda por esclarecer mas, dado o possível impacto de diferentes polimorfismos na actividade desta enzima e o seu consequente efeito na resposta e toxicidade do tratamento, a realização de mais estudos, com vista a esclarecer estes mecanismos, pode ser bastante benéfica para a optimização dos tratamentos nestes doentes.

Polimorfismos no gene ABCC2 (MDR2)

O *ABCC2* rs17222723 é um SNP não sinónimo do gene *ABCC2* que codifica para a proteína *MDR2* que actua no efluxo da vincristina e doxorrubicina. Indivíduos com DLBCL, portadores dos genótipos AT/AA evidenciaram piores valores de sobrevivência livre de complicações. (Rossi et al., 2009)

Polimorfismos no gene ABCB1 (MDR1)

O gene *MDR1* localiza-se no cromossoma 7 e codifica para a proteína P-gp, uma proteína transportadora de efluxo. Mais de 50 SNPs estão descritos para este gene mas três deles ocorrerem mais frequentemente (10%) em várias populações. São eles o C3435T, C1236T e G2677T/A. O polimorfismo C3435T afecta o tempo de sobrevivência em casos de DLBCL e a sua associação com outro polimorfismo, o G2677T/A, parece afectar a eficácia dos esquemas de quimioterapia. Não parece, contudo, haver relação entre estes SNPs e o risco de NHL. A expressão desta proteína pode variar de acordo com os diferentes haplótipos, o que explica a observação de diferentes respostas ao tratamento. A proteína 2677T demonstrou ter maior capacidade de transporte que a proteína 2677G e o genótipo homozigótico C3435T para o alelo variante T (3435TT), demonstrou estar associado a uma maior expressão de mRNA *MDR1*. Tendo em conta estes dados, uma das hipóteses para a variabilidade na resposta ao tratamento refere que doentes com o genótipo 2677TT e 3435TT possam ter maior transporte de efluxo e portanto são menos sensíveis à quimioterapia, apresentando por isso piores taxas de sobrevivência (Hu, L.-L., Yu, B., e Yang, J, 2013; Santo & Medeiros, 2013).

Estes polimorfismos têm, também, sido considerados biomarcadores independentes de prognóstico (Hu, L.-L. et al., 2013; Santo & Medeiros, 2013).

A presença de outro polimorfismo, *MDR1* -T129C, mais concretamente do genótipo heterozigótico TC, revelou estar relacionada com o risco de DLBCL. A observação, numa população chinesa, em tecidos colórectais, de maiores níveis de mRNA *MDR1* no genótipo heterozigótico, em comparação com o genótipo homozigótico *MDR1* -129TT, sugere um mecanismo molecular associado a esta relação entre este genótipo e o desenvolvimento de DLBCL (Hu, L.-L. et al., 2013).

Polimorfismos no gene SLC22A16

O gene SLC22A16 está localizado no cromossoma 6q21 e codifica para um polipéptido de 577 aminoácidos. Vários estudos sugerem que alterações na expressão desta proteína podem ter implicações na farmacodinâmica e farmacocinética da doxorubicina em doentes com cancro (Lal, Mahajan, Chen, & Chowbay, 2010).

Num estudo levado a cabo por Novak et al. foram identificadas mutações como a perda de CNA (alteração do número de cópias) e variações de um nucleótido (R150Q, L325R e H49Y) no gene SLC22A16, em células de pacientes com DBLCL e, posteriormente, analisada a sua relevância biológica na progressão da doença. Verificou-se, então, que a perda de CNA não se relacionava com a progressão, recidiva ou novo tratamento, 24 meses após o diagnóstico nestes doentes. As mutações L325R e R150Q, por sua vez, localizam-se na entrada/saída do poro de translocação o que sugere um possível impacto das mesmas na função e no transporte da doxorubicina enquanto a mutação H49Y não sugeriu ter qualquer impacto. Assim, o significado destas mutações em termos funcionais está ainda por explorar, principalmente porque são raras. Apesar disso, os dados sugerem que a SLC22A16 transporta a 14C doxorubicina em células com DLBCL e que a perda desta proteína através da deleção ou mutação do gene podem afectar a sensibilidade destas células em relação a terapêuticas que incluam a doxorubicina (Novak et al., 2015).

Polimorfismos nos genes carbonil reductase

- CBR1

A Carbonil reductase 1 (*CBR1*) é uma enzima metabolizadora de antraciclina. Suspeita-se que esta possa estar envolvida na toxicidade de antraciclina (Figura 9) uma vez que os SNPs rs20572 e rs9024 foram associados a uma diminuição do metabolismo da doxorubicina e daunorrubicina e este metabolismo está associado à expressão da carbonil reductase (Jordheim et al., 2015). Previamente, alguns estudos tinham já detectado o polimorfismo 1096G>A (rs9024) em amostras de DNA de fígados humanos e verificado que o genótipo GG tinha tendência a níveis mais elevados de mRNA, em comparação com o genótipo heterozigótico G/A. Além disso, citosóis hepáticos com o genótipo homozigótico G/G desmonstraram taxas de síntese de doxorubicinol, um metabolito cardiotóxico da doxorubicina, mais elevadas.. De referir, ainda, que este

polimorfismo foi detectado apenas em doadores de raça branca, colocando a hipótese de que a maior incidência de toxicidade em doentes de raça negra, encontrada em estudos clínicos pediátricos, pode estar relacionada com a escassez do alelo variante (A) nos indivíduos de descendência Africana (Gonzalez-Covarrubias, Zhang, Kalabus, Relling, & Blanco, 2009).

Ainda antes, em 2008, tinha sido verificado que, em doentes asiáticos com cancro da mama, os diplótipos com pelo menos um alelo variante resultantes dos polimorfismos 627C> T (rs20572) e +967G> A (rs9024) estavam correlacionados com níveis mais elevados de exposição à doxorubicina, sugerindo a possibilidade de menor conversão em doxorubicinol intracelular nestes doentes (Lal et al., 2008)

Desta forma, informações sobre as determinantes genéticas específicas, referentes à variável actividade de CBR1, podem ajudar a otimizar a terapia anticancerígena com antraciclina (Gonzalez-Covarrubias et al., 2009).

- CBR3

A relação entre o polimorfismo V244M, G>A (rs1056892) e a toxicidade cardíaca relacionada com antraciclina foi descrita em dois estudos, ambos em crianças sobreviventes de cancro (entre os quais linfoma de Hodgkin e linfoma não Hodgkin). Este polimorfismo dá origem a duas isoformas, a proteína *CBR3* V244 (alelo G) e a *CBR3* M244 (alelo A), sendo que a primeira demonstrou sintetizar doxorubicinol 2,6 vezes mais depressa. Os doentes com o genótipo homocigótico GG apresentavam maior risco de toxicidade e a hipótese colocada é que estes indivíduos, provavelmente, tinham uma taxa de síntese miocárdica de metabolitos de álcool C-13 cardiotoxicos superior à dos indivíduos com o alelo A. Apesar disto, a contribuição específica deste metabolismo para a formação destes metabolitos continua por determinar. (J. G. Blanco et al., 2011; Javier G Blanco et al., 2008)

De referir que num dos estudos os doentes tinham sido submetidos a baixas doses de antraciclina. Visto que a cardiotoxicidade, na presença de doses elevadas, é mediada sobretudo pelo stress oxidativo, consequente deste excesso de antraciclina metabolizadas, do que propriamente pelos metabolitos cardiotoxicos de álcool das antraciclina, o impacto deste polimorfismo não estava, neste caso, associado a elevadas doses de antraciclina (> 250 mg/m²) (J. G. Blanco et al., 2011).

Polimorfismos no gene AKR1C3

Em relação a este gene que codifica para a aldo-keto reductase 1C3, uma enzima que metaboliza vários compostos, nomeadamente a doxorrubicina, as maiores evidências, medidas em termos de resultados de sobrevivência, dizem respeito ao polimorfismo rs10508293. O raro genótipo homocigótico CC em doentes com DLBCL demonstrou uma associação com um aumento do risco, progressão da doença e mortalidade desta doença. (Gustafson et al., 2014).

6.2.Rituximab

O rituximab é um anticorpo monoclonal cujo alvo são os linfócitos patogénicos que expressam o antígeno CD20 à sua superfície. Este pode induzir a morte das células através de vários mecanismos (ilustrados a Figura 8): citotoxicidade dependente do complemento (CDC), citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) e outros mecanismos de indução da apoptose que podem ou não ser mediados pelo receptor Fc γ (Oflazoglu & Audoly, 2010; Pauwels et al., 2012).

A ligação de complexos antígeno-anticorpo e complexos Fc-Fc γ R ao antígeno CD20 pode activar vias apoptóticas intrínsecas (signal A e signal B) e, assim, induzir a morte celular programada (PCD). No caso da CDC o rituximab activa a cascata do complemento causando um ataque à membrana e consequente morte celular; na ADCC dá-se o recrutamento de células efectoras através da ligação aos receptores Fc γ das mesmas, o que resulta na libertação de proteínas e proteases que vão causar a morte celular das células alvo; o recrutamento de monócitos/macrófagos (através da ligação aos seus receptores Fc γ) na ADCP vai fazer com que as células tumorais sejam rodeadas por anticorpos (Oflazoglu & Audoly, 2010).

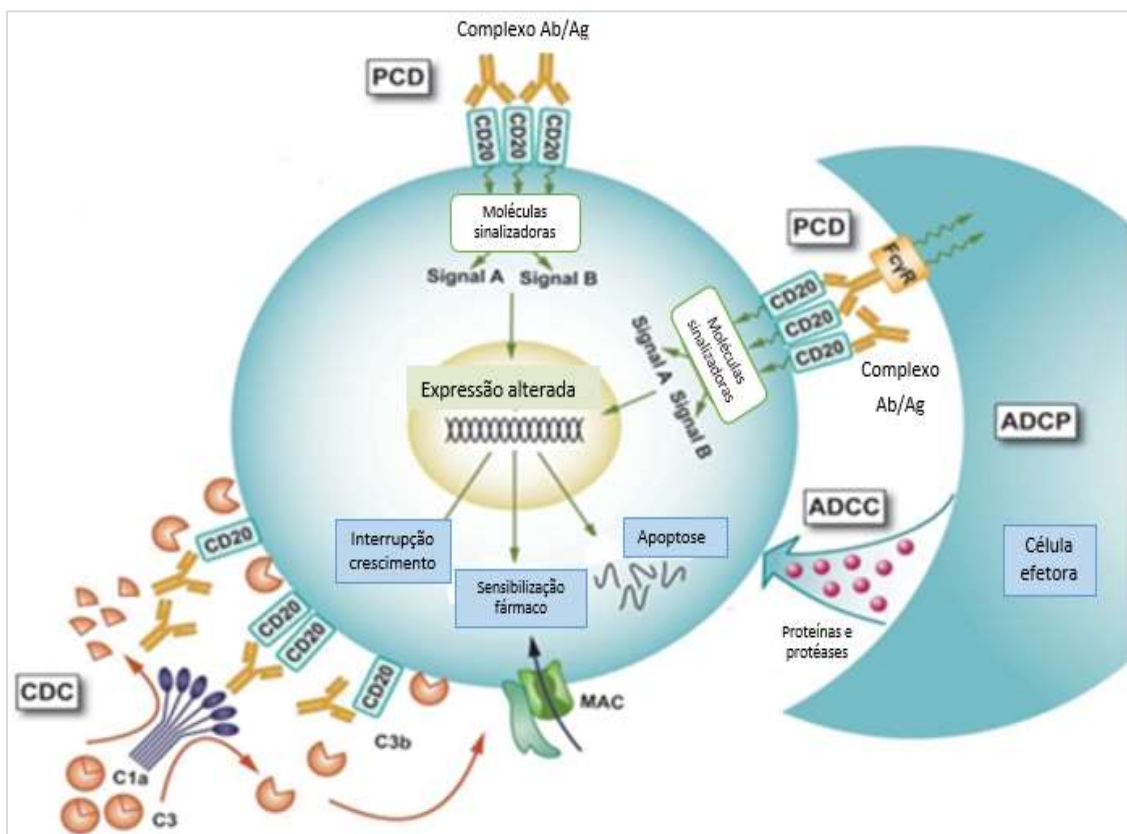


Figura 12-Mecanismo de acção do Rituximab (adaptado de Oflazoglu & Audoly, 2010)

Polimorfismos no gene STAT3

A STAT3 pertence a uma família de transdutores de sinal e activadores da transcrição que regulam a proliferação, divisão e apoptose celular através da mediação da expressão dos genes envolvidos nos mesmos. O seu papel na proliferação e sobrevivência das células de DLBCL demonstrou ser essencial. Assim, este pode ser um indicador de prognóstico e um alvo ideal na terapia de DLBCL (Al Zaid Siddiquee & Turkson, 2008)

Estudos sugerem que o rituximab inibe a fosforilação da STAT3 induzindo a apoptose das células neoplásicas (Alas & Bonavida, 2001)

Um estudo envolvendo 166 doentes com DLBCL tratados com rituximab, entre 2007 e 2010, analisou o impacto do polimorfismo STAT3 rs2293152 no prognóstico destes doentes (Hu et al., 2014). Os genótipos e a sua respectiva frequência, analisados no estudo referido, encontram-se enumerados na tabela 4.

Tabela 5- Genótipos e respectiva frequência

Genótipo	Nº doentes(%)
CC	31 (18,7%)
GG	57 (34,3%)
CG	78 (47%)

O alelo G apresentou maior frequência (55,3%) do que o alelo C (44,8%). Para além disso, a presença dos genótipos homocigóticos GG/CC demonstrou ser superior no sexo masculino. A análise dos resultados neste estudo aponta para melhores taxas de resposta ao rituximab em doentes com os genótipos homocigóticos, que, assim, beneficiavam de um regime de quimioterapia que incluísse este agente. A presença deste polimorfismo pode, deste modo, servir de biomarcador preditivo da eficácia da terapêutica (Hu et al., 2014).

6.3.Ciclofosfamida

A ciclofosdamida é um pró-fármaco que necessita sofrer activação por parte de enzimas do complexo hepático CYP 450, originando o metabolito 4-hidroxíciclofosmamida que co- existe com o seu tautómero aldofosfamida. Esta activação é mediada pela CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5 e CYP2C9. A aldofosfamida, por sua vez, sofre decomposição química e origina o agente alquilante mustarda fosforamida e um metabolito tóxico, a acroleína (Emadi, Jones, & Brodsky, 2009; Gor et al., 2010).

A inactivação e eliminação da 4- hidroxíciclofosfamida é mediada por enzimas de fase II (GSTA, GSTM,GSTP,GSTT) através da conjugação com tióis ou sulfatos, por aldeído desidrogenases e transportadores ABC (Gor et al., 2010; Raccor et al., 2012).

Estudos demonstraram que SNPs funcionais nestas enzimas envolvidas no metabolismo da ciclofosfamida podem influenciar a resposta a terapêuticas no cancro, diga-se, a sobrevivência e recidiva. (Su et al., 2010).

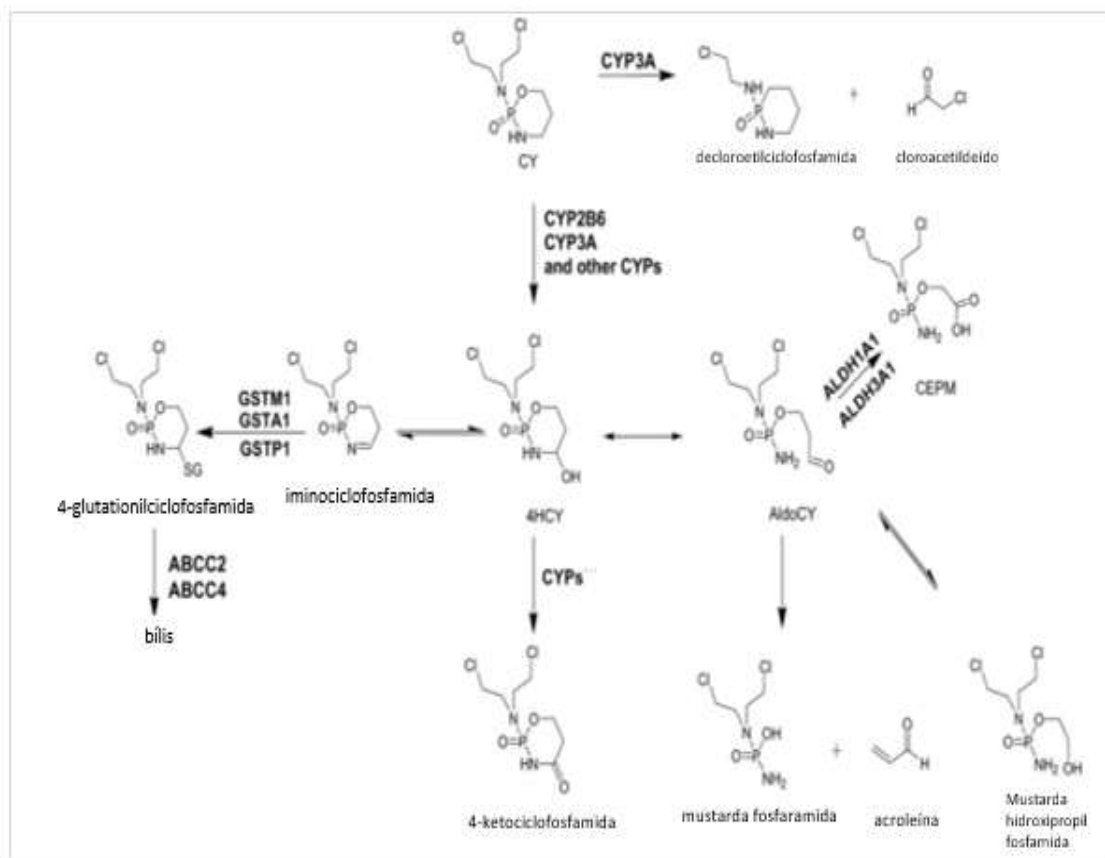


Figura 13-Metabolismo da ciclofosfamida (adaptado de Raccor et al., 2012)

Polimorfismos no gene GSTA1

O gene GSTA1 codifica para uma enzima que catalisa a conjugação da ciclofosfamida e dos seus metabolitos activos com a glutiona aumentando a solubilidade destes em água e facilitando, deste modo, a sua excreção. Doentes com DLBCL, com o genótipo *GSTA1* CT/TT (rs3957357) demonstraram melhor EFS em comparação com o genótipo CC. Resultados semelhantes foram observados no cancro da mama. Além disso, este polimorfismo foi associado ao risco de toxicidade e outros aspectos clínicos relacionados com regimes contendo ciclofosfamida o que reforça a ideia do seu envolvimento na farmacogenética da ciclofosfamida (Rossi et al., 2009).

7. Implicações Farmacogenéticas na terapêutica do linfoma não Hodgkin: polimorfismos e biomarcadores

Foram já identificadas várias mutações frequentes em mais de 300 genes em casos com DLBCL. Nesta lista dos genes mais frequentemente mutados estão incluídos o TP53, MYD88, PIM1, CARD11, BCL6, CREBBP, EZH2 entre muitos outros (Vaqué et al., 2014)

O aparecimento de técnicas de sequenciação cada vez mais evoluídas permitiu a identificação de três subtipos de linfoma com base na sua célula de origem: células tipo B do centro germinativo (GCB), células tipo B activadas (ABC ou subtipo não-GCB) e, ainda, outro subtipo cujas características não permitem concretamente a sua classificação nos outros subtipos. Os subtipos partilham mutações genéticas recorrentes envolvidas em vários mecanismos do sistema imunitário (B2M e CD58), na modificação da cromatina (MLL2, CREBBP e EP300), na regulação dos linfomas de células B (BCL6), na actividade de proteínas (MEF2B) e no ciclo celular e apoptose (FOXO1 e TP53) (Intlekofer & Younes, 2014). A classificação molecular destes subtipos está então relacionada com estas mudanças genéticas, por exemplo, translocações que afectam o oncogene BCL2 estão presentes em cerca de 30% – 40% dos casos de GCB-DLBCL, enquanto as translocações envolvendo o BCL6 ocorrem principalmente no subtipo ABC (Intlekofer & Younes, 2014; Jardim, 2014.; Vaqué et al., 2014).

O subtipo ABC demonstrou estar associado a pior prognóstico. Este subtipo caracteriza-se pela activação de NF- κ B através da tirosina cinase de Bruton (BTK), sugerindo, deste modo, um novo alvo terapêutico para diferentes agentes como o ibrutinib, um inibidor covalente da BTK. (Ruan et al., 2011). Aliás, a adição de bortezomib, um inibidor da via NF- κ B ao regime quimioterapêutico já demonstrou uma melhoria da sobrevivência em doentes com este subtipo. (Lenz, 2013)

Translocações no gene MYC e nos oncogenes BCL2 e BCL6, em casos de DLBCL foram consistentemente relatados. A translocação MYC ocorre em cerca de 5% a 10% dos casos de DLBCL e, em cerca de 21-83% dos casos de DLBCL com essa translocação, também ocorre a translocação nos genes BCL2 e/ou BCL6, num fenómeno conhecido como *double-hit*, caso se verifiquem dois rearranjos concomitantes, ou *triple-hit*, caso se verifiquem os três (Aukema et al., 2011; Horn et al., 2013).

O MYC é um factor de transcrição envolvido na oncogénese através da regulação de diversos genes que participam na proliferação celular, no crescimento e na replicação de DNA (Carbone, Gloghini, Kwong, & Younes, 2014). Este pode induzir a apoptose, provocando o aumento da expressão do gene TP53 ou através da amplificação das vias de sinalização da apoptose (N. A. Johnson et al., 2012; Slack & Gascoyne, 2011). A sua desregulação está maioritariamente associada a translocações mas também amplificações, mutações e mecanismos dependentes de microRNA podem provocar um aumento da sua expressão (Visco et al., 2013).

O BCL2, por sua vez, é um oncogene que codifica para uma proteína anti-apoptose. Deste modo, o seu aumento de expressão pode estar envolvido na resistência à quimioterapia. Este aumento molecular, por sua vez, pode estar relacionado com translocações mas, tal como acontece com o gene MYC, também outros mecanismos podem provocar esta desregulação, nomeadamente a amplificação do locus 18q21, frequentemente observada no subtipo de DLBCL não-GCB (Carbone et al., 2014; J. Z. Huang et al., 2002).

Em relação ao factor de transcrição BCL6, este está envolvido em translocações cromossomais no DLBCL. A repressão que exerce no gene PRMD1 impede a diferenciação terminal das células B (Wagner et al., 2011).

Várias investigações constataram que doentes com *double-hit* MYC/BCL2, com DLBCL, respondem fracamente aos tratamentos actualmente disponíveis (Perry et al., 2014; Adam M Petrich, Nabhan, & Smith, 2014; M. Pfreundschuh, 2012).

Apesar disso, é ainda controverso se o prognóstico relacionado com a presença individual da translocação MYC difere daquele relacionado com a presença da translocação dupla MYC/BCL2. Por exemplo, as investigações de Cuccuini et al., Aukema et al. e Valera et al. observaram prognósticos semelhantes (fracos prognósticos) tanto em casos com apenas a translocação MYC como também naqueles com a translocação MYC/BCL2 (Aukema et al., 2011; Cuccuini et al., 2012; Valera et al., 2013). Por outro lado, as investigações de Johnson et al., Green et al. e Landsburg et al. não observaram nenhum impacto adverso na presença de apenas a translocação MYC enquanto os doentes com as ambas as translocações (MYC/BCL2) demonstraram piores resultados (Green et al., 2012; N. A. Johnson et al., 2012; Landsburg, Nasta, Svoboda, Morrissette, & Schuster, 2014).

Os rearranjos concomitantes MYC e BCL6 ocorrem menos frequentemente e o seu impacto no prognóstico ainda não está clarificado, com investigações que referem

resultados divergentes (Pillai, Sathanoori, Van Oss, & Swerdlow, 2013; Tzankov et al., 2013).

As hipóteses apontadas para os diferentes resultados são o pequeno número de casos investigados, diferenças nos parâmetros clínico-patológicos (idade, sexo e IPI) e a presença adicional de outras variações genéticas, como mutações no gene TP53, que podem, deste modo, alterar o valor da translocação MYC como prognóstico. É importante a realização de estudos prospectivos com um número significativo de casos a fim de obter conclusões mais esclarecedoras (Clipson et al., 2015)

O fenómeno *triple-hit* é raro e apesar de também estar ligado a um pior prognóstico não existem evidências de que este é pior do que o *double-hit*.

Posto isto, o impacto da ocorrência independente destas mutações em relação ao prognóstico da doença é controverso, mas parece ser consensual que tanto o fenómeno *double-hit* como o *triple-hit* estão associados a pior prognóstico. Ainda, visto a expressão aumentada de ambas as proteínas MYC e BCL2 apontar para uma relação com uma pior resposta aos tratamentos, esta associação pode futuramente ser utilizada como marcador de prognóstico em doentes com DLBCL e para a identificação de doentes que possam, por ventura, beneficiar de uma terapêutica adaptada aos mesmos, em particular, doentes com o subtipo GCB (Perry et al., 2014).

As mutações e/ou deleções no gene TP53, que codifica para uma proteína supressora de tumor, a p53, observam-se em diversas neoplasias e estão associadas ao risco de vários cancros. A perda da sua função contribui para a progressão tumoral. Deleções alélicas foram observadas em diversos NHL, nomeadamente MZL, FL, e DLBCL (Carbone et al., 2014; Z. Y. Xu-Monette et al., 2012). A presença destas variações genéticas pode servir como preditor negativo de prognóstico em doentes com DLBCL submetidos a regimes de R-CHOP, assim como uma ferramenta no desenvolvimento de novos tratamentos mais individualizados, com diferentes alvos terapêuticos (Jia et al., 2012; Smardova, 2011; Zijun Y Xu-Monette et al., 2012).

Dado o papel que as proteínas MYC e p53 desempenham na apoptose e proliferação tumoral, a sua desregulação pode ter um efeito sinérgico na progressão do tumor e resistência à quimioterapia, tal como acontece com a co-expressão de MYC/BCL2 (Xie et al., 2014).

O polimorfismo *TP53* Pro72Arg é um SNP não-sinónimo envolvendo a substituição de uma arginina (CGC) por uma prolina (CCC) no nucleótido 466 do exão 4. Este dá origem a uma proteína com menor capacidade para induzir a apoptose ou

suprimir a transformação celular. A presença do alelo C (variante prolina) está ligada a menor apoptose e, em conformidade, verificou-se que a sua presença estava associada a um aumento do risco de NHL (494 doentes com DLBCL, 182 doentes com linfoma de células T, e 269 com outros linfomas) (Kim et al., 2010).

A enzima MTHFR é essencial no metabolismo dos folatos e síntese de DNA. A diminuição da sua expressão pode levar a anomalias na cadeia de DNA que, se não forem reparadas, podem levar ao aparecimento de tumores. A presença de dois SNPs no gene que codifica para a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) pode estar relacionada com a susceptibilidade para o linfoma não Hodgkin. Os SNPs deste gene, que se localiza no cromossoma 1p36.3, estão, então, associados a uma menor actividade da enzima codificada pelo mesmo e são eles o SNP C677T (Ala222Val, rs1801133) e A1298C (Glu429Ala, rs1801131). O primeiro localiza-se no exão 4 e leva à troca de uma alanina por valina. Os génotipos CT e TT têm, respectivamente, 60% e 30% da actividade da enzima “wild type”. Quanto ao segundo, está localizado no exão 7 e a enzima do génotipo CC tem cerca de 60% da actividade da enzima “wild-type”. Os dados referentes aos diversos estudos indicam uma forte possibilidade da presença destes SNPs estar associada à susceptibilidade de NHL, particularmente para o linfoma folicular, em caucasianos e brancos. Ainda assim, os autores sugerem que, a fim de se poder aferir com rigor esta possibilidade, é necessário um estudo prospectivo com uma amostra significativa (J. He et al., 2014).

O gene BCL2L11, no cromossoma 2q13, codifica para a proteína BCL2L11. A ligação desta proteína a proteínas do tipo Bcl-2 pro-sobrevivência provoca o início da apoptose. O polimorfismo rs3789068 (G> A BCL2L11) demonstrou uma associação com um maior risco de linfomas de células B (nomeadamente de DLBCL, FL, SLL/CLL). Em contraste, o SNP rs3132453 no gene PRRC2A (A> C PRRC2A) revelou uma associação com menor risco dos subtipos de linfoma mencionados. Este polimorfismo localiza-se numa região de genes associados ao complemento HLA classe III. A sua função biológica é desconhecida, mas pode estar relacionada com a sua proximidade do gene BAG6, um regulador da apoptose, com um importante papel na morte das células DLBCL. Estas descobertas sugerem a implicação da variabilidade genética na região HLA na patogénese de linfomas de células B. (Nieters et al., 2012).

O factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o factor de crescimento fibroblástico (bFGF) básico podem potenciar angiogénese e o crescimento dos linfomas.

O SNP +936 C/T (rs3025039) no gene VEGF, que se localiza no cromossoma 6p21.3, foi associado à perda de um potencial local de ligação para o factor de transcrição AP-4. A presença do alelo T demonstrou estar fortemente associada a um pior prognóstico em doentes com NHL. No caso do gene bFGF, localizado no cromossoma 4, polimorfismos na sua região promotora podem influenciar a sua expressão. Verificou-se que a substituição C> G na posição -921 (rs308395) estava presente em doentes com subtipos de NHL mais agressivos. Apurou-se, então, que a presença destes polimorfismos em genes que codificam factores pro-angiogénicos está relacionada com a susceptibilidade e progressão desta doença e vão de encontro à hipótese de que a progressão de tumores hematológicos é influenciada pela formação de novos vasos sanguíneos. Contudo estas conclusões estão limitadas pelo pequeno tamanho da amostra em estudo (78 doentes) mas contribuem, de qualquer das formas, para o conhecimento de potenciais factores genéticos que possam estar envolvidos no desenvolvimento de NHL (Wróbel et al., 2013).

A presença do polimorfismo rs1799977 no gene MLH1 é um preditor de resposta no linfoma folicular. Estas observações vão de encontro ao envolvimento deste gene na farmacodinâmica da doxorubicina previamente mencionadas nesta monografia. Neste caso, os doentes com o genótipo variante GG não beneficiaram da adição da doxorubicina ao esquema terapêutico R-CVP. Além disso, este genótipo não afectou os resultados em doentes cujo regime não inclui este fármaco. O mecanismo envolvido nesta diferença interindividual não está ainda compreendido mas verificou-se que em células tumorais de outros cancros este polimorfismo estava relacionado com uma menor expressão da proteína MLH1 (Davide Rossi et al., 2015).

8. Implicações farmacogenéticas no linfoma de Hodgkin: polimorfismos e biomarcadores

Ribrag et al analisaram a relação entre polimorfismos do gene UGT1A1 e o prognóstico de doentes com Hodgkin submetidos a um regime de quimioterapia com antraciclinas. A região promotora deste gene contém entre 5 a 8 repetições TA, sendo o alelo mais comum, em caucasianos, o que contém 6 repetições. ((TA)₆). Quando se observam 7 repetições nucleotídicas de TA o alelo é denominado de UGT1A1*28. Os resultados deste estudo demonstraram que os doentes com a repetição homozigótica (TA)₆ apresentavam valores menores de tempo de sobrevivência, tempo até recidiva e ausência de progressão, quando comparados com doentes com pelo menos um alelo UGT1A1*28. Esta enzima parece ser responsável pela glucuronização de vários agentes anticancerígenos como antraciclinas e vinca alcalóides, presentes nos regimes utilizados no tratamento dos linfomas. Os autores colocaram, assim, a hipótese destes resultados se deverem a uma menor metabolização dos fármacos, por parte da enzima resultante, em doentes com o alelo UGT1A1*28. Esta poderia, contudo, levar também a uma maior exposição dos doentes a citotóxicos. Não obstante, os autores verificaram, então, que, apesar de uma maior proporção de doentes portadores do alelo UGT1A1*28 apresentar toxicidade, esta não era significativa mas sugere, apesar disto, uma ligação entre a eficácia e a toxicidade do regime e os polimorfismos deste gene (Ribrag et al., 2009). Os mesmos resultados, relativos ao tempo de sobrevivência, foram demonstrados num outro estudo (Yri et al., 2012).

Apesar do impacto deste polimorfismo no prognóstico da doença, os autores não encontraram qualquer associação entre a presença deste alelo e o risco de HL (Sud, Hemminki, & Houlston, 2015).

As enzimas de fase II da família GST desintoxicam o organismo de vários agentes quimioterapêuticos por conjugação dos mesmos e/ou seus respectivos metabolitos com a glutatona, sendo as mais importantes a GSTA, GSTP, GSTT e GSTM. Várias investigações descrevem a relação entre polimorfismos presentes nestes genes e a sua relação com o risco e prognóstico do HL (Yri et al., 2012).

Em relação ao gene que codifica para a GSTP1, o polimorfismo verificado consiste na substituição do alelo major A pelo alelo minor G (A313G, rs1695), o que leva a uma substituição do aminoácido isoleucina (Ile) por valina (Val). Deste modo, observam-se três genótipos diferentes: o heterozigótico AG (Ile/Val), o genótipo “wild type” AA

(Ile/Ile) e o menos prevalente, o genótipo GG (Val/Val). Os resultados em relação à presença deste polimorfismo são controversos. Um estudo indica que a presença do genótipo GG nos indivíduos está associada a um maior risco de HL (Yri et al., 2012), enquanto outro indica que é o genótipo “wild type” (AA) o que está relacionado com pior prognóstico. Estes autores sugerem que a associação do genótipo AA com um pior prognóstico se deve ao facto do alelo normal (A) estar envolvido numa maior actividade contra os agentes anticancerígenos, para além de reduzir a proliferação celular e proteger contra a apoptose. Em contraste, o alelo variante, apesar de não influenciar a proliferação celular, protege as células da apoptose. (Kriachok et al., 2012; Lourenço et al., 2009)

Outras investigações, no entanto, não encontraram relação entre estes polimorfismos e o prognóstico da doença (Bin & Luo, 2012; Ribrag et al., 2009). A explicação para estas discrepâncias pode estar no facto de as populações em estudo terem origens diferentes, estratos socioeconómicos diferentes, serem submetidas a diferentes tratamentos e se encontrarem em diferentes estádios da doença. Também pelo facto de esta enzima demonstrar diferente actividade de acordo com o substrato, levando a diferentes exposições a carcinogénicos das populações em estudo (Yri et al., 2012; Kriachok et al., 2012; Lourenço et al., 2009).

Os polimorfismos estudados nos genes GSTT1 e GSTM1 são aqueles que envolvem deleções. A comparação entre indivíduos portadores do genótipo nulo de GTT1 com indivíduos portadores do genótipo sem deleção indica que os primeiros têm maior predisposição para HL. Por sua vez, não existem evidências de uma associação entre o alelo nulo de GSTM1 e o risco de linfoma. (Yri et al., 2012). Mais uma vez, voltam a surgir discrepâncias entre os vários estudos, onde os autores defendem não existir relação entre a presença destes polimorfismos e o risco de HL (Bin & Luo, 2012; Ribrag et al., 2009). As razões apontadas são o tamanho das amostras, diferenças nas populações e o facto de muitos estudos não estabelecerem a diferença entre o genótipo deletado hétero e homozigótico (Yri et al., 2012).

A presença do SNP A313G no gene GSTP1 parece estar relacionada com o tempo de sobrevivência sem complicações após o tratamento em doentes com mais de 40 anos com HL. A comparação de doentes com o genótipo AA e doentes com o genótipo AG/GG demonstrou que os valores de EFS eram menores nos primeiros. Este polimorfismo parece alterar tanto os níveis desta enzima como o respectivo metabolismo de agentes alquilantes, como a ciclofosfamida (Kriachok et al., 2012; Yri et al., 2012).

A citocina Il-10 é uma citocina produzida pelas células B e T, assim como pelas células de Reed –Sternberg. A sua expressão pode ser alterada por SNPs na região promotora 5'. A comparação do genótipo de referência AA com os genótipos AT,TT e a combinação TT/AT revela uma associação entre a presença do alelo T com um menor risco de HL, em doentes com idades acima dos 40 anos. Além disso, observou-se que portadores do genótipo homozigótico AA tinham menos tempo de sobrevivência e menos tempo livre de progressão, ou seja este é um preditor negativo de prognóstico (Yri et al., 2012).

9.Perspectivas Futuras

9.1.Avanços tecnológicos

Recentes avanços tecnológicos permitiram reconhecer que os tumores têm distinta composição molecular e que podem ser subdivididos de acordo com estas diferenças. Deste modo, cada tipo específico de tumor pode responder melhor a uma combinação específica de fármacos (Intlekofer & Younes, 2014).

A heterogeneidade molecular dos DLBCLs foi decifrada através da análise do perfil de expressão genética (GEP), método que utiliza microarrays de DNA, que permitiu, deste modo, a identificação de três subtipos moleculares de DLBCL distintos: GCB, ABC e PMBL (Linfoma primário do mediastino de grandes células B) (Vaidya & Witzig, 2014).

Infelizmente, devido aos elevados custos, o GEP não é comum na prática clínica, estando o seu uso limitado, geralmente, a instituições académicas. Como alternativa são muitas vezes utilizados método imunohistoquímicos. Contudo, a concordância entre os resultados obtidos a partir deste método e os resultados de GEP não excede os 80% (Staton, Koff, Chen, Ayer, & Flowers, 2015; Younes, 2015).

Recentemente no âmbito do projecto “Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project”, foi desenvolvido um ensaio digital, com base na expressão genética (Lymph2Cx), para a determinação do subtipo de DLBCL, de acordo com a sua célula de origem (COO), em amostras de biópsias embebidas em parafina fixada em formalina (FFPET), que pode trazer os métodos de caracterização molecular para a prática clínica (Scott et al., 2015).

Testado por vários laboratórios independentes o Lymph2Cx demonstrou ser um teste preciso com resultados concordantes de COO entre os diferentes laboratórios. Assim sendo, com a sua portabilidade e resultados após cerca de 36h, demonstra ser um teste promissor para aplicação clínica nas amostras de FFPET de biópsias, usadas rotineiramente para o diagnóstico de linfomas. A sua utilização pode permitir a selecção dos doentes para ensaios clínicos e, em última análise, o desenvolvimento de uma terapêutica direccionada (Dunleavy, Roschewski, & Wilson, 2014; Scott et al., 2015; Staton et al., 2015).

A última década ficou marcada pelo aparecimento de tecnologias de sequencição de nova geração (NGS-Next Generation Sequencing) que trouxeram à luz novos

conhecimentos sobre as bases genéticas de diferentes neoplasias hematológicas. Os NGS são capazes de sequenciar milhares de pequenos fragmentos de DNA ao mesmo tempo (em paralelo) o que aumenta o seu rendimento (Figura 9) (Braggio, Egan, Fonseca, & Stewart, 2013).

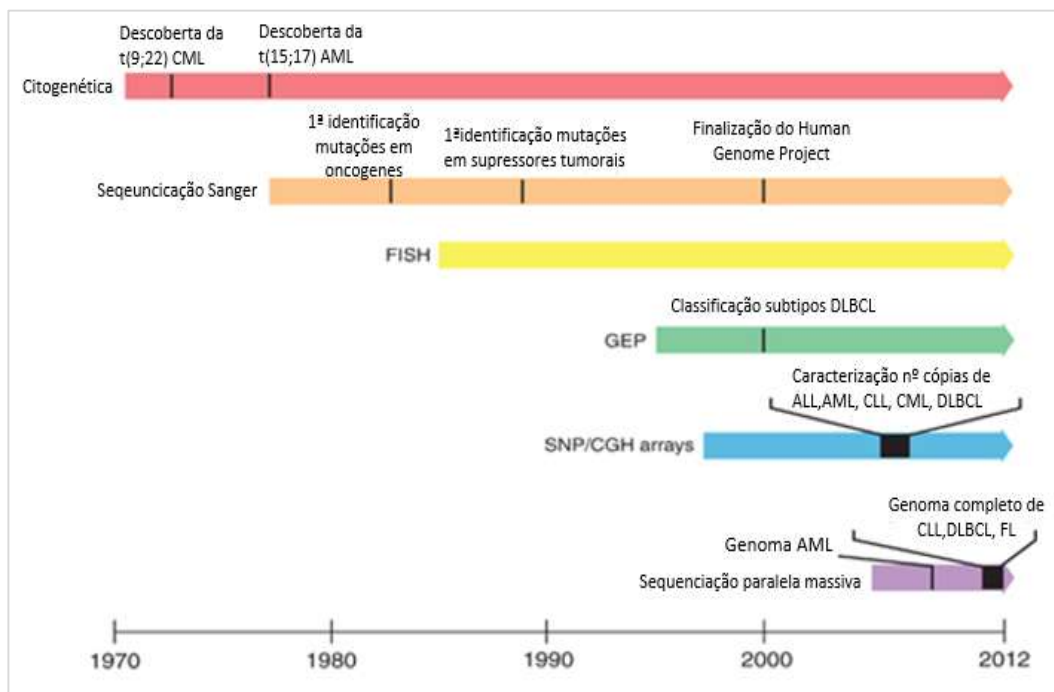


Figura 14-Evolução dos métodos de detecção genética (adaptado de Braggio et al., 2013)

Actualmente, encontramos-nos na era molecular da definição da doença, métodos moleculares como o GEP e NGS são métodos promissores para a elucidação da patogénese e prognóstico de DLBCL. Contudo, apesar de úteis para pesquisa, estes não são fáceis de aplicar rotineiramente na prática clínica. A sua complexidade e custos elevados, assim como a necessidade da utilização de tecidos congelados faz com que estes ainda não estejam vastamente disponíveis (Dunleavy et al., 2014; Intlekofer & Younes, 2014).

A aplicação destas técnicas de sequenciação de alto rendimento no estudo dos linfomas forneceu novos dados em relação às alterações do genoma envolvidas no DLBCL, evidenciando anomalias moleculares como mutações, rearranjos e alterações no número de cópias. Deste modo o conhecimento acerca da patogénese destes linfomas têm vindo a aumentar e novos fármacos estão a ser desenvolvidos, tendo como alvos estas alterações moleculares ou vias de sinalização (Jardin et al, 2014).

9.2.Mutações recorrentes e oportunidades terapêuticas

EZH2

A proteína (EZH2) é a componente catalítica do complexo repressivo PCR2 e é responsável pela adição de grupos metil à Lys27 da histona 33 (H3K27). Esta está envolvida na repressão de genes anti- proliferativos (como CDK1NA) e na supressão de genes envolvidos na diferenciação de células B do centro germinativo (IRF4 e PRMD1) (Béguelin et al., 2013).

Mutações recorrentes nesta enzima foram encontradas em cerca de 20% de GB-DLBCLs e em de casos linfoma folicular. A mutação mais comum, associada ao linfoma, ocorre na tirosinase 641 (Y641) e causa a substituição de Y641 por fenilalanina (Y641) ou arginina (Y641N). Estas mutações resultam num ganho de função que provoca a trimetilação da H3K27 e a repressão excessiva dos genes alvo do complexo PCR2 (Morin et al., 2010).

A inibição directa da EZH2 através de agentes como GSK126, GSK343, GSK503, EPZ005687 e E11 diminui a proliferação e induz a apoptose das células em linhas celulares mutantes de DLBCL. Esta inibição está associada a uma diminuição da metilação de H3K27 e reactivação dos genes alvo do PCR2 (Béguelin et al., 2013; Knutson et al., 2012; McCabe et al., 2012; Qi et al., 2012).

Actualmente os inibidores E743875 (um inibidor oral) e GSK281612676 encontram-se em fase de ensaios clínicos em pacientes com recidiva de DLBCL ou linfoma folicular (Intlekofer & Younes, 2014).

Vias de sinalização BCR

A via de sinalização BCR é essencial para o desenvolvimento das células B e na patogénese das neoplasias de células B, apresentando-se como um alvo apelativo no tratamento dos linfomas (Niemann & Wiestner, 2013).

O complexo BCR é constituído por uma Imunoglobulina (IgM) que se liga aos domínios CD79A e CD79B. Após esta ligação, os domínios CD79A e CD79B são fosforilados pela proteína LYN, da família SRC, o que leva à activação SYK e, consequentemente, à sinalização da cascata PI3K-BTK. Posteriormente, o BTK forma um complexo com BLNK e promove a produção de DAG e IP3 conduzindo à activação de PKC β , do complexo CBM (CARD11/BCL10/MALT1) e da sinalização de NF- κ B, que transmite o sinal até ao núcleo para que a célula se divida (Figura 10) (Jardin, 2014).

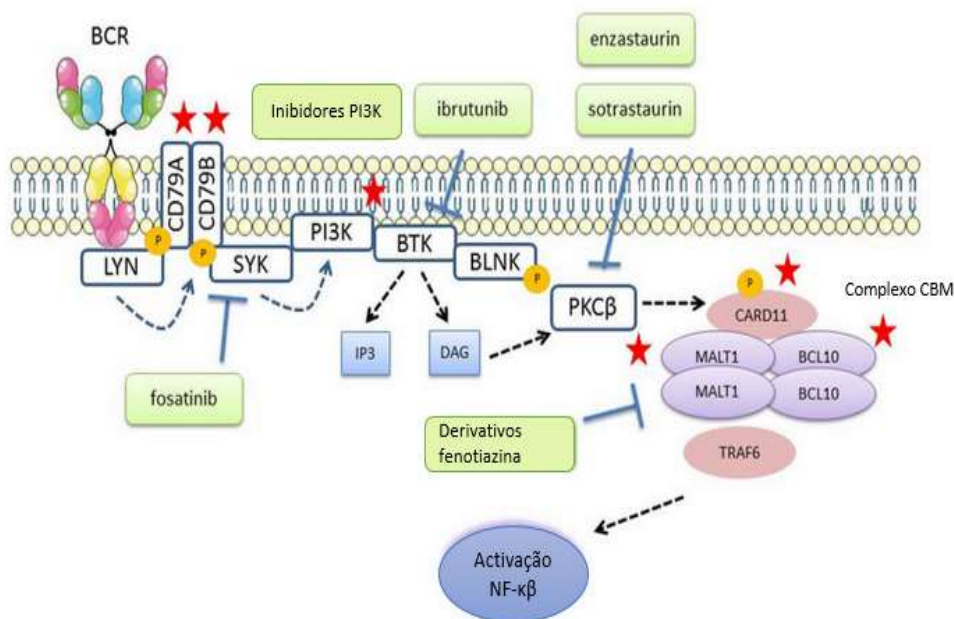


Figura 15-Alvos terapêuticos na via de sinalização BCR (adaptado de Jardim et al.,2014)

Assim, agentes farmacológicos que têm como alvo estes efectores têm sido desenvolvidos. O dasatinib, para a família de cinases de tirosina SRC, inibidores SYK como o fostamatinib e o ibrutinib, um inibidor BTK cujo valor no tratamento de DLBCL refractário foi já comprovado (Advani et al., 2013; Das et al., 2006; Friedberg et al., 2009). Também a Sotrastaurin, um inibidor da PKC β , está a ser testada tanto individualmente, como em conjunto com o everolimus, um inibidor mTOR, em doentes CD79 mutantes ou com o subtipo ABC (Jardim, 2014; Naylor et al., 2011).

A análise de biópsias antes e após o tratamento com ibrutinib demonstrou que, tanto os doentes com o CD79B “wild-type”, como com CD79B mutado, responderam ao tratamento, o que coloca a hipótese de que o ibrutinib não necessita de uma mutação BCR para ser eficaz e sugere a existência de mecanismos de sinalização alternativos ao BCR (Zheng, Ding, Song, Feng, & Zhu, 2014).

A análise de mutações de doentes com ABC DLBCL demonstrou também que alterações no gene CARD11 eram indicadoras de resistência ao ibrutinib, resultados consistentes com a capacidade do CARD11 alterado activar a regulação negativa de BTK através da via sinalização NF- κ B (Davis et al., 2010).

MYD88 e receptores TLR em ABC DLBCL

A MYD88 é uma proteína crítica nas vias de sinalização dos receptores TLR 7,8 e 9 e da interleucina 1 (Figura 14). O TLR e ILR-1 interagem com a MYD88 através dos domínios TIR. Subsequentemente, a MYD88, por intermédio do domínio de morte, associa-se ao IRAK1 provocando a fosforilação de IRAK4, formando o complexo IRAK1/IRAK2/MYD88 que, juntamente com o TRAF6 e TAK1, activam a via de sinalização NF- κ B, essencial no desenvolvimento, proliferação e sobrevivência de células B. Está, actualmente, a ser testado um inibidor de TLR 7, 8 e 9, o IMO-8400, em doentes com macroglobulinémia Waldenstrom e em doentes com DLBCL refractário com a mutação L265P no gene MYD88 (Jardin, 2014; Roschewski, Staudt, & Wilson, 2014)

A relação entre a presença de mutações no gene MYD88 e a sensibilidade ao inbrutinib também foi analisada. Doentes com mutações MYD88, CY79A e CYD79B demonstraram ser sensíveis ao ibrutinib enquanto doentes com uma mutações MYD88 mas sem mutação CD79A ou CD79B, demonstraram resistência ao ibrutinib. A identificação desta mutação pode, assim, permitir a selecção dos doentes que melhor responderão ao tratamento.(Wilson et al., 2012)

Outros alvos podem, ainda, incluir proteínas mediadoras da sinalização de MYD88, como IRAK4 e TAK1 (Jardin, 2014).

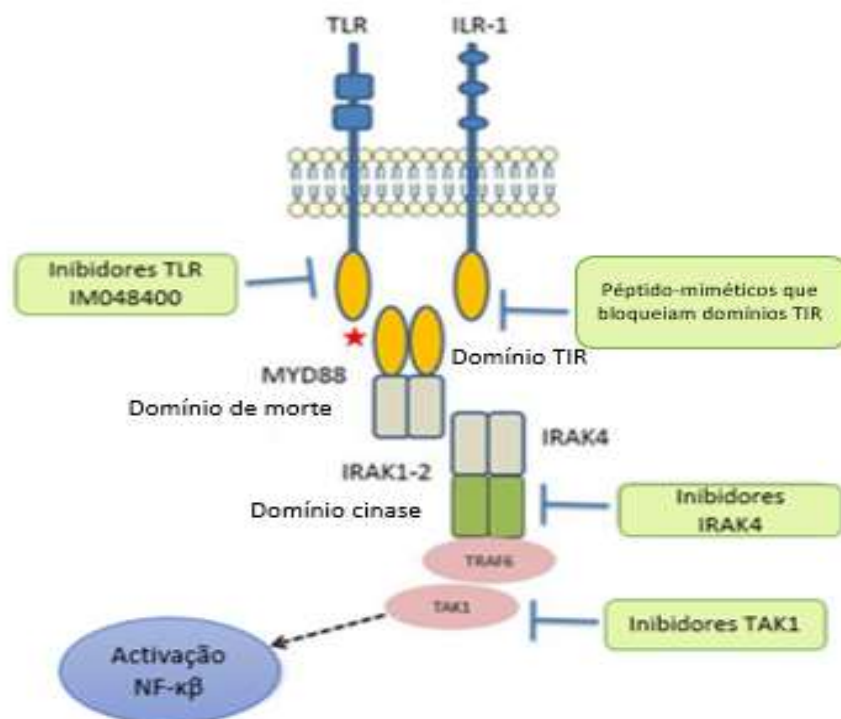


Figura 16-MYD88 e TLR como alvos terapêuticos em ABC DLBCL (adaptado de Jardin et al.,2014)

Via PI3K/Akt/mTOR em GC DLBCL

A via de sinalização PI3K está activa em muitos mecanismos celulares responsáveis pela progressão tumoral e demonstrou ser activada, através de diversos mecanismos, nas neoplasias de células B (Rodon, Dienstmann, Serra, & Tabernero, 2013).

A deleção de PTEN é observada apenas em casos de DLBCL e parece estar ligada à via Akt em casos de DLBCL com a translocação t(14;18). A inibição PI3K através do inibidor pan-PI3K LY294002 demonstrou toxicidade em linhas celulares negativas para PTEN, o que sugere que doentes PTEN-negativos irão responder a uma terapia que iniba a via PI3K/Akt (Pfeifer et al., 2013).

O Idelalisib (antes chamado de CAL-101) é uma pequena molécula que demonstrou ser capaz de inibir a isoforma p110 δ da PI3K in vitro (Lannutti et al., 2011).

O everolimus e temsirolimus são inibidores do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) que demonstraram cerca 25% – 30% de actividade em vários linfomas agressivos como DLBCL, linfoma de células do manto e o linfoma folicular (Smith et al., 2010; Witzig et al., 2011).

Inibidores Akt, como o MK-2206, têm também sido explorados (A. M. Petrich et al., 2012).

IRF4

A expressão de IRF-4 estimula a diferenciação das células B e é um alvo de factores de transcrição da via de sinalização NF- κ B. Este é induzido pelas vias de sinalização BCR e TLR (Rui, Schmitz, Ceribelli, & Staudt, 2011). A lenalidomida é uma agente que provoca regulação negativa de IRF4, conduzindo à inibição da sinalização NF- κ B e conseqüente morte das células ABC.DLBCL(Figura 12)(Yang et al., 2012).

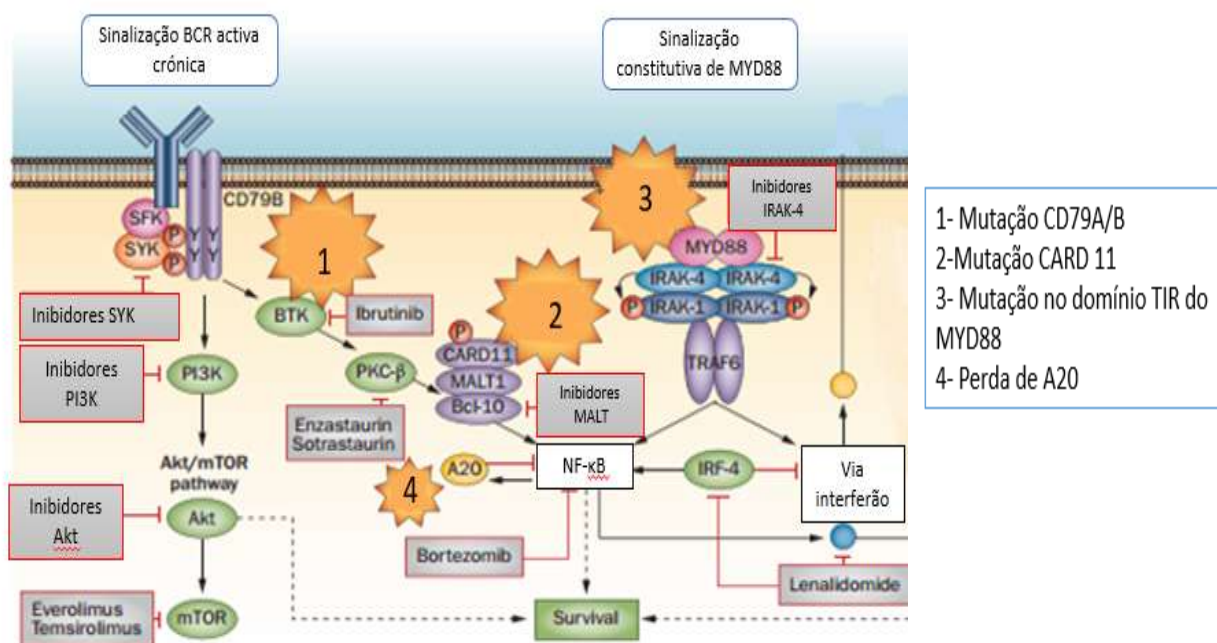


Figura 17-Potenciais alvos terapêuticos e os novos fármacos em desenvolvimento para os NHL (adaptado de Roschewski, Staudt, & Wilson, 2014)

Inibição BCL2 em GC DLBCL

O gene BCL2 encontra-se desregulado, através de diversos mecanismos, nos DLBCLs. Estudos demonstraram que se trata, aliás, do gene mais frequentemente mutado em caso de GC DLBCL, o que o torna um atractivo alvo terapêutico (Schuetz et al., 2012).

O ABT-199 é um inibidor de 2ª geração que demonstrou actividade numa variedade de linfomas de células B e que está actualmente a ser testado em casos de recidiva, em combinação com bendamustina e rituximab (Roschewski et al., 2014).

Inibição BCL6

Esta proteína está envolvida na regulação da reacção do centro germinativo e repressão de genes envolvidos na proliferação, sobrevivência, crescimento celular e metabolismo (Basso & Dalla-Favera, 2010).

O inibidor 79-6, que actua ao ligar-se ao domínio BCL6-BTB, demonstrou ser capaz de provocar a morte de células humanas de DLBCL (Cerchietti et al., 2010).

10. Conclusão

O tratamento dos linfomas assenta em agentes citotóxicos que podem, portanto, provocar efeitos tóxicos nos doentes sujeitos a regimes terapêuticos que os incluam. Além disso os casos de recidiva e o número de mortes após o tratamento, nestes casos, representam ainda uma preocupação. Deste modo, a possibilidade de um tratamento mais eficaz que provoque menos efeitos adversos e aumente a eficácia é bastante apelativa.

Em relação às implicações farmacogenéticas no tratamento de DLBCL com R-CHOP, diversos estudos descrevem a presença de polimorfismos e a sua influência na resposta à terapêutica, risco e prognóstico desta doença.

No que diz respeito aos genes que codificam para as subunidades da enzima, NADPH, verificou-se que polimorfismos no gene *CYBA*, *NCF4* e *RAC2*, parecem estar relacionados, com a toxicidade induzida por antraciclina, como a doxorubicina. Apesar de não estar bem estabelecida a relação entre os polimorfismos analisados e a sua influência na actividade desta enzima, os resultados obtidos indicam que a realização de mais estudos pode ser útil para explicar a variabilidade na tolerância cardíaca às antraciclina e para estabelecer grupos de risco mais susceptíveis a esta toxicidade.

Polimorfismos envolvidos nas proteínas implicadas no transporte da doxorubicina, nomeadamente a *ABCC2* e a *ABCB1* estão relacionado com o risco e com o prognóstico dos linfomas e a perda de *SLC22A16*, através de mutações ou deleções genéticas, pode estar implicada na sensibilidade das células tumorais à doxorubicina.

A presença de polimorfismos em genes que codificam para as enzimas metabolizadoras de antraciclina, *CBR1* e *CBr3* demonstrou estar relacionada com a cardiotoxicidade presente nos doentes sujeitos ao tratamento com R-CHOP. SNPs nos genes *MLH1* e *MPO* estão associados à resposta à terapêutica e no gene *AKR1C3* a presença do genótipo homozigótico *CC* demonstrou associação entre o aumento do risco, progressão da doença e mortalidade.

Um dos fármacos incluídos no regime de quimioterapia para o tratamento de DLBCL, o rituximab, influencia a fosforilação da *STAT3* e, conseqüentemente, a morte das células tumorais. Posto isto, a presença de polimorfismos neste gene demonstrou associação entre a resposta à terapêutica e a possibilidade de servir como um biomarcador preditivo da eficácia deste tratamento.

O gene *GSTA1* codifica para uma enzima metabolizadora da ciclofosfamida e verificou-se que os indivíduos com DLBCL com o genótipo *CT/TT* resultante do

polimorfismo rs3957357 apresentavam melhores valores de sobrevivência sem complicações.

Actualmente, estão bem caracterizados três tipos distintos de DLBCL, com base na sua célula de origem, sendo que o subtipo ABC está associado a pior prognóstico. Deste modo, os doentes podem ser divididos de acordo com as características do tumor. O estudo do genoma de doentes com DLBCL permitiu identificar várias mutações frequentes, nomeadamente nos genes BCL2, BCL6, MYC e TP53, que diferem entre os três subtipos. Algumas destas mutações têm sido alvo de especial interesse pelo seu potencial como alvos terapêuticos. Por exemplo, o bortezomib e o ibrutinib estão em ensaios clínicos para os doentes afectados por ABC DLBCL, enquanto, inibidores de EZH2 e BCL6 podem ser utilizados em doentes afectados por GCB DLBCL.

Também em relação ao linfoma de Hodgkin se verificou que polimorfismos nas enzimas de metabolização UGT1A1, GSTA1, GSTP1, GSTT1 e GSTM1 se relacionam com o risco, prognóstico e resposta à terapêutica.

Por fim, não há dúvidas do imenso potencial benéfico da farmacogenética mas a sua aplicação clínica enfrenta ainda vários desafios. Ainda assim, os avanços na tecnologia e os resultados de várias investigações demonstraram resultados promissores para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogénese dos linfomas e o impacto que a variabilidade genética pode ter no tratamento dos mesmos.

Bibliografia

- Advani, R. H., Buggy, J. J., Sharman, J. P., Smith, S. M., Boyd, T. E., Grant, B., ... Fowler, N. H. (2013). Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *31*(1), 88–94. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.7906>
- Al Zaid Siddiquee, K., & Turkson, J. (2008). STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Research*, *18*(2), 254–267. <http://doi.org/10.1038/cr.2008.18>
- Alas, S., & Bonavida, B. (2001). Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic. *Cancer Research*, *61*(13), 5137–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431352>
- Al-Dayel, F., Al-Rasheed, M., Ibrahim, M., Bu, R., Bavi, P., Abubaker, J., ... Al-Kuraya, K. (2008). Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP1A1, GSTT and GSTP contribute to the development of diffuse large B-cell lymphoma risk in the Saudi Arabian population. *Leukemia & Lymphoma*, *49*(1), 122–9. <http://doi.org/10.1080/10428190701704605>
- Altés, A., Paré, L., Esquirol, A., Xicoy, B., Rámila, E., Vicente, L., ... Baiget, M. (2013). Pharmacogenetic analysis in the treatment of Hodgkin lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, *54*(8), 1706–1712. <http://doi.org/10.3109/10428194.2012.752080>
- Ardeshna, K. M., Smith, P., Norton, A., Hancock, B. W., Hoskin, P. J., MacLennan, K. A., ... Linch, D. C. (2003). Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, *362*(9383), 516–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12932382>
- Aukema, S. M., Siebert, R., Schuurin, E., van Imhoff, G. W., Kluin-Nelemans, H. C., Boerma, E.-J., & Kluin, P. M. (2011). Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*, *117*(8), 2319–31. <http://doi.org/10.1182/blood-2010-09-297879>

- Bag, A., Bag, N., & Jyala, N. (2012). Indian studies on genetic polymorphisms and cancer risk. *Indian Journal of Cancer*, 49(1), 144. <http://doi.org/10.4103/0019-509X.98941>
- Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2010). BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Advances in Immunology*, 105, 193–210. [http://doi.org/10.1016/S0065-2776\(10\)05007-8](http://doi.org/10.1016/S0065-2776(10)05007-8)
- Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunological Reviews*, 247(1), 172–183. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01112.x>
- Béguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K. L., Rosen, M., ... Melnick, A. M. (2013). EZH2 Is Required for Germinal Center Formation and Somatic EZH2 Mutations Promote Lymphoid Transformation. *Cancer Cell*, 23(5), 677–692. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.011>
- Bin, Q., & Luo, J. (2012). Role of polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma risk: a Human Genome Epidemiology (HuGE) review. *Leukemia & Lymphoma*. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428194.2012.706284?journalCode=ilal20>
- Blanco, J. G., Leisenring, W. M., Gonzalez-Covarrubias, V. M., Kawashima, T. I., Davies, S. M., Relling, M. V., ... Bhatia, S. (2008). Genetic polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene CBR3 and the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene NQO1 in patients who developed anthracycline-related congestive heart failure after childhood cancer. *Cancer*, 112(12), 2789–95. <http://doi.org/10.1002/cncr.23534>
- Blanco, J. G., Sun, C.-L., Landier, W., Chen, L., Esparza-Duran, D., Leisenring, W., ... Bhatia, S. (2011). Anthracycline-Related Cardiomyopathy After Childhood Cancer: Role of Polymorphisms in Carbonyl Reductase Genes--A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 30(13), 1415–1421. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.8987>
- Braggio, E., Egan, J. B., Fonseca, R., & Stewart, A. K. (2013). Lessons from next-generation sequencing analysis in hematological malignancies. *Blood Cancer Journal*, 3(7), e127. <http://doi.org/10.1038/bcj.2013.26>
- Campa, D., Butterbach, K., Slager, S. L., Skibola, C. F., de Sanjosé, S., Benavente, Y.,

- ... Nieters, A. (2012). A comprehensive study of polymorphisms in the ABCB1, ABCC2, ABCG2, NR1I2 genes and lymphoma risk. *International Journal of Cancer*, *131*(4), 803–812. <http://doi.org/10.1002/ijc.26436>
- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications, *117*(19), 5019–5033. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050>
- Carbone, A., Gloghini, A., Kwong, Y.-L., & Younes, A. (2014). Diffuse large B cell lymphoma: using pathologic and molecular biomarkers to define subgroups for novel therapy. *Annals of Hematology*, *93*(8), 1263–77. <http://doi.org/10.1007/s00277-014-2116-y>
- Cascales, A., Pastor-Quirante, F., Sánchez-Vega, B., Luengo-Gil, G., Corral, J., Ortuño-Pacheco, G., ... de la Peña, F. A. (2013). Association of anthracycline-related cardiac histological lesions with NADPH oxidase functional polymorphisms. *The Oncologist*, *18*(4), 446–53. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0239>
- Cerchietti, L. C., Ghetu, A. F., Zhu, X., Da Silva, G. F., Zhong, S., Matthews, M., ... Melnick, A. (2010). A Small-Molecule Inhibitor of BCL6 Kills DLBCL Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Cell*, *17*(4), 400–411. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.050>
- Charlab, R., & Zhang, L. (2013). *Pharmacogenomics: historical perspective and current status*. (F. Innocenti & R. H. N. van Schaik, Eds.) *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1015). Totowa, NJ: Humana Press. <http://doi.org/10.1007/978-1-62703-435-7>
- Chial, H. (2008). DNA sequencing technologies key to the Human Genome Project. Retrieved September 28, 2015, from <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-sequencing-technologies-key-to-the-human-828>
- Chiu, B. C.-H., & Hou, N. (2015). Epidemiology and etiology of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Treatment and Research*, *165*, 1–25. http://doi.org/10.1007/978-3-319-13150-4_1
- Chu, H., Wang, M., Wang, M., Gu, D., Wu, D., Zhang, Z., ... Zhang, Z. (2010). The MPO

- 463G>A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 43 case-control studies. *Mutagenesis*, 25(4), 389–95. <http://doi.org/10.1093/mutage/geq018>
- Clipson, A., Barrans, S., Zeng, N., Crouch, S., Grigoropoulos, N. F., Liu, H., ... Du, M.-Q. (2015). The prognosis of MYC translocation positive diffuse large B-cell lymphoma depends on the second hit. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 1(3), 125–133. <http://doi.org/10.1002/cjp2.10>
- Cuccuini, W., Briere, J., Mounier, N., Voelker, H.-U., Rosenwald, A., Sundstrom, C., ... Thieblemont, C. (2012). MYC+ diffuse large B-cell lymphoma is not salvaged by classical R-ICE or R-DHAP followed by BEAM plus autologous stem cell transplantation. *Blood*, 119(20), 4619–4624. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-01-406033>
- Das, J., Chen, P., Norris, D., Padmanabha, R., Lin, J., Moquin, R. V., ... Barrish, J. C. (2006). 2-aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies toward the discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(23), 6819–32. <http://doi.org/10.1021/jm060727j>
- Davis, R. E., Ngo, V. N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R. M., Romesser, P. B., ... Staudt, L. M. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 463(7277), 88–92. <http://doi.org/10.1038/nature08638>
- Deenen, M. J., Cats, A., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2011). Part 2: pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. *The Oncologist*, 16(6), 820–34. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0259>
- Dotan, E., Aggarwal, C., & Smith, M. R. (2010). Impact of Rituximab (Rituxan) on the Treatment of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 35(3), 148–57. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2844047&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dreyling, M., Ghielmini, M., Marcus, R., Salles, G., Vitolo, U., & Ladetto, M. (2014). Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice

- Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25(suppl 3), iii76–iii82. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdu200>
- Dunleavy, K., Roschewski, M., & Wilson, W. H. (2014). Precision treatment of distinct molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma: ascribing treatment based on the molecular phenotype. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(20), 5182–93. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0497>
- Eichelbaum, M., Ingelman-Sundberg, M., & Evans, W. E. (2006). Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annual Review of Medicine*, 57, 119–37. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.56.082103.104724>
- Eichenauer, D. a., Engert, a., Andre, M., Federico, M., Illidge, T., Hutchings, M., & Ladetto, M. (2014). Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25(suppl 3), iii70–iii75. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdu181>
- Eichenauer, D. A., Engert, A., André, M., Federico, M., Illidge, T., Hutchings, M., & Ladetto, M. (2014). Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 25 Suppl 3(suppl_3), iii70–5. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdu181>
- Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M., & Buske, C. (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26(suppl 5), v78–v84. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdv303>
- Ekhart, C., Rodenhuis, S., Smits, P. H. M., Beijnen, J. H., & Huitema, A. D. R. (2009). An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 35(1), 18–31. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.003>
- Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. a. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(11), 638–647. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>
- Engert, A., & Younes, A. (Eds.). (2015). *Hodgkin Lymphoma*. Cham: Springer

- International Publishing. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-12505-3>
- Evans, W. E., & Relling, M. V. (1999). Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *October*, 286(October).
- Fowler, N. H. (2011). Role of maintenance rituximab (rituxan) therapy in the treatment of follicular lymphoma. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 36(9), 590–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3278141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Freedman, A. (2014). CME Information: Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management management, 89(4), 429–436. <http://doi.org/10.1002/ajh.00033>
- Friedberg, J. W., Sharman, J., Sweetenham, J., Johnston, P. B., Vose, J. M., LaCasce, A., ... Shipp, M. A. (2009). Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 115(13), 2578–2585. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-08-236471>
- Georg Lenz, M.D., and Louis M. Staudt, M.D., P. D. G. (2010). Aggressive Lymphomas. Retrieved September 9, 2015, from <http://www.nejm.org/sci-hub.club/doi/full/10.1056/NEJMra0807082>
- Gisselbrecht, C., Glass, B., Mounier, N., Singh Gill, D., Linch, D. C., Trneny, M., ... Schmitz, N. (2010). Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(27), 4184–90. <http://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.1618>
- Gisselbrecht, C., Schmitz, N., Mounier, N., Singh Gill, D., Linch, D. C., Trneny, M., ... Glass, B. (2012). Rituximab maintenance therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with relapsed CD20(+) diffuse large B-cell lymphoma: final analysis of the collaborative trial in relapsed aggressive lymphoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(36), 4462–9. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.41.9416>
- Gonzalez-Covarrubias, V., Zhang, J., Kalabus, J. L., Relling, M. V., & Blanco, J. G. (2009). Pharmacogenetics of human carbonyl reductase 1 (CBR1) in livers from

- black and white donors. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 37(2), 400–7. <http://doi.org/10.1124/dmd.108.024547>
- Gopal, A. K., Ramchandren, R., O'Connor, O. a., Berryman, R. B., Advani, R. H., Chen, R., ... Zain, J. (2012). Safety and efficacy of brentuximab vedotin for Hodgkin lymphoma recurring after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 120(3), 560–568. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-12-397893>
- Gor, P. P., Su, H. I., Gray, R. J., Gimotty, P. A., Horn, M., Aplenc, R., ... DeMichele, A. (2010). Cyclophosphamide-metabolizing enzyme polymorphisms and survival outcomes after adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Research: BCR*, 12(3), R26. <http://doi.org/10.1186/bcr2570>
- Green, T. M., Young, K. H., Visco, C., Xu-Monette, Z. Y., Orazi, A., Go, R. S., ... Moller, M. B. (2012). Immunohistochemical Double-Hit Score Is a Strong Predictor of Outcome in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *Journal of Clinical Oncology*, 30(28), 3460–3467. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.4342>
- Guerard, E. J., & Bishop, M. R. (2012). Overview of non-Hodgkin's lymphoma. *Disease-a-Month : DM*, 58(4), 208–18. <http://doi.org/10.1016/j.disamonth.2012.01.010>
- Gustafson, H. L., Yao, S., Goldman, B. H., Lee, K., Spier, C. M., LeBlanc, M. L., ... Briehl, M. M. (2014). Genetic polymorphisms in oxidative stress-related genes are associated with outcomes following treatment for aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *American Journal of Hematology*, 89(6), 639–645. <http://doi.org/10.1002/ajh.23709>
- Han, X., Zheng, T., Foss, F. M., Lan, Q., Holford, T. R., Rothman, N., ... Zhang, Y. (2010). Genetic polymorphisms in the metabolic pathway and non-Hodgkin lymphoma survival. *American Journal of Hematology*, 85(1), 51–6. <http://doi.org/10.1002/ajh.21580>
- He, J., Liao, X.-Y., Zhu, J.-H., Xue1, W.-Q., Shen, G.-P., Huang, S.-Y., ... Jia, & W.-H. (2014). Association of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms with non-Hodgkin lymphoma susceptibility: Evidence from a meta-analysis. *Scientific Reports* (Vol. 4). Retrieved from

<http://www.nature.com/srep/2014/140822/srep06159/pdf/srep06159.pdf>

- He, Y., Hoskins, J. M., & McLeod, H. L. (2011). Copy number variants in pharmacogenetic genes. *Trends in Molecular Medicine*, *17*(5), 244–51. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.01.007>
- Hiddemann, W., Kneba, M., Dreyling, M., Schmitz, N., Lengfelder, E., Schmits, R., ... Unterhalt, M. (2005). Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: r. *Blood*, *106*(12), 3725–32. <http://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0016>
- Hoffmann, M., Schirmer, M. A., Tzvetkov, M. V., Kreuz, M., Ziepert, M., Wojnowski, L., ... Brockmoller, J. (2010). A Functional Polymorphism in the NAD(P)H Oxidase Subunit CYBA Is Related to Gene Expression, Enzyme Activity, and Outcome in Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Research*, *70*(6), 2328–2338. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2388>
- Horn, H., Ziepert, M., Becher, C., Barth, T. F. E., Bernd, H., Alfred, C., ... Tr, L. (2013). MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma LYMPHOID NEOPLASIA MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma, *121*(12), 2253–2263. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435842>
- Hu, L.-L., Yu, B., & Yang, J. (2013). MDR1 polymorphisms associated with risk and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, *54*(6), 1188–1193. <http://doi.org/10.3109/10428194.2012.736980>
- Hu, Y., Ding, N., Jin, X., Feng, L., Ping, L., Song, Y., & Zhu, J. (2014). Genetic polymorphisms of STAT3 correlated with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab. *Cancer Cell International*, *14*(1), 25. <http://doi.org/10.1186/1475-2867-14-25>
- Huang, J. Z., Sanger, W. G., Greiner, T. C., Staudt, L. M., Weisenburger, D. D., Pickering, D. L., ... Chan, W. C. (2002). The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood*, *99*(7), 2285–90. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895757>

Huang, R. S., & Ratain, M. J. (2009). Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59(1), 42–55. <http://doi.org/10.3322/caac.20002>

Intlekofer, A. M., & Younes, A. (2014). Precision therapy for lymphoma — current state and future directions. *Nature Publishing Group*. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.137>

Itchaki, G., Lahav, M., Vidal, L., Raanani, P., Shpilberg, O., & Paul, M. (2013). Anthracycline-containing regimens for treatment of follicular lymphoma in adults (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *The Cochrane Library*.

Jardin, F. (2014). Next Generation Sequencing and the Management of Diffuse Large B-cell Lymphoma: From Whole Exome Analysis to Targeted Therapy. *Discovery Medicine*, 18(97), 51–65. Retrieved from <http://www.discoverymedicine.com/Fabrice-Jardin/2014/07/next-generation-sequencing-and-the-management-of-diffuse-large-b-cell-lymphoma-from-whole-exome-analysis-to-targeted-therapy/>

Jia, Z., He, J., Cen, L., Han, W., Jiang, N., Yang, J., & Zhou, M. (2012). P53 deletion is independently associated with increased age and decreased survival in a cohort of Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 53(11), 2182–5. <http://doi.org/10.3109/10428194.2012.686106>

Johnson, G. G., Lin, K., Cox, T. F., Oates, M., Sibson, D. R., Eccles, R., ... Pettitt, A. R. (2013). CYP2B6*6 is an independent determinant of inferior response to fludarabine plus cyclophosphamide in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 122(26), 4253–8. <http://doi.org/10.1182/blood-2013-07-516666>

Johnson, N. A., Slack, G. W., Savage, K. J., Connors, J. M., Ben-Neriah, S., Rogic, S., ... Gascoyne, R. D. (2012). Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(28), 3452–9. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0985>

- Joyce, H., McCann, A., Clynes, M., & Larkin, A. (2015). Influence of multidrug resistance and drug transport proteins on chemotherapy drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *1*, 1–15. <http://doi.org/10.1517/17425255.2015.1028356>
- Kim, H. N., Yu, L., Kim, N. Y., Lee, I.-K., Kim, Y.-K., Yang, D.-H., ... Kim, H.-J. (2010). Association with TP53 codon 72 polymorphism and the risk of non-Hodgkin lymphoma. *American Journal of Hematology*, *85*(10), 822–4. <http://doi.org/10.1002/ajh.21834>
- Kitzmiller, J. P., Groen, D. K., Phelps, M. A., & Sadee, W. (2011). Pharmacogenomic testing: relevance in medical practice: why drugs work in some patients but not in others. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, *78*(4), 243–57. <http://doi.org/10.3949/ccjm.78a.10145>
- Knutson, S. K., Wigle, T. J., Warholic, N. M., Sneeringer, C. J., Allain, C. J., Klaus, C. R., ... Kuntz, K. W. (2012). A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nature Chemical Biology*, *8*(11), 890–6. <http://doi.org/10.1038/nchembio.1084>
- Kriachok, I. a, Khranovska, N. M., Svergun, N. M., Filonenko, K. S., Novosad, O. I., Titorenko, I. B., ... Pastushenko, I. V. (2012). The influence of GSTP1 A313G polymorphism on susceptibility , chemotherapy-related toxicity and prognosis of Hodgkin ' s lymphoma in Ukrainian patients. *Byopolymers and Cell*, *28*(1), 56–61. Retrieved from <http://core.kmi.open.ac.uk/display/5836590> \n <http://connection.ebscohost.com/c/articles/75118870/influence-gstp1-a313g-polymorphism-susceptibility-chemotherapy-related-toxicity-prognosis-hodgkins-lymphoma-ukrainian-patients>
- Küppers, R., Engert, A., & Hansmann, M. (2012). Hodgkin lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(10), 3439–3447. <http://doi.org/10.1172/JCI61245>. Previous
- Lal, S., Sandanaraj, E., Wong, Z. W., Ang, P. C. S., Wong, N. S., Lee, E. J. D., & Chowbay, B. (2008). CBR1 and CBR3 pharmacogenetics and their influence on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Science*. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00903.x>

- Landsburg, D. J., Nasta, S. D., Svoboda, J., Morrissette, J. J. D., & Schuster, S. J. (2014). “Double-Hit” cytogenetic status may not be predicted by baseline clinicopathological characteristics and is highly associated with overall survival in B cell lymphoma patients. *British Journal of Haematology*, *166*(3), 369–74. <http://doi.org/10.1111/bjh.12901>
- Lannutti, B. J., Meadows, S. A., Herman, S. E. M., Kashishian, A., Steiner, B., Johnson, A. J., ... Giese, N. A. (2011). CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*, *117*(2), 591–4. <http://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275305>
- Lee, J. W., Aminkeng, F., Bhavsar, A. P., Shaw, K., Carleton, B. C., Hayden, M. R., & Ross, C. J. D. (2014). The emerging era of pharmacogenomics: current successes, future potential, and challenges. *Clinical Genetics*, *86*(1), 21–28. <http://doi.org/10.1111/cge.12392>
- Lenz, G. (2013). Novel therapeutic targets in diffuse large B-cell lymphoma. *EJC Supplements : EJC : Official Journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer ... [et Al.]*, *11*(2), 262–3. <http://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.041>
- Lourenço, G. J., Néri, I. a., Sforzi, V. C. S., Kameo, R., Lorand-Metze, I., & Lima, C. S. P. (2009). Polymorphisms of glutathione S-transferase Mu 1, glutathione S-transferase theta 1 and glutathione S-transferase Pi 1 genes in Hodgkin’s lymphoma susceptibility and progression. *Leukemia & Lymphoma*, *50*(6), 1005–1009. <http://doi.org/10.1080/10428190902878455>
- Ma, Q., & Lu, A. Y. H. (2011). Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacological Reviews*, *63*(2), 437–59. <http://doi.org/10.1124/pr.110.003533>
- Mani, H., & Jaffe, E. S. (2009). Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, *9*(3), 206–16. <http://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.042>
- Marcus, K. J., & Tishler, R. B. (2010). Head and Neck Carcinomas Across the Age Spectrum: Epidemiology, Therapy, and Late Effects. *Seminars in Radiation*

Oncology, 20(1), 52–57. <http://doi.org/10.1016/j.semradonc.2009.09.004>

Marcus, R., Imrie, K., Solal-Celigny, P., Catalano, J. V., Dmoszynska, A., Raposo, J. C., ... Stein, G. (2008). Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(28), 4579–86. <http://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.5376>

McCabe, M. T., Ott, H. M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G. S., ... Creasy, C. L. (2012). EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*, 492(7427), 108–112. <http://doi.org/10.1038/nature11606>

McLeod, H. L. (2013). Cancer Pharmacogenomics: Early Promise, But Concerted Effort Needed. *Science*, 339(6127), 1563–1566. <http://doi.org/10.1126/science.1234139>

Morin, R. D., Johnson, N. A., Severson, T. M., Mungall, A. J., An, J., Goya, R., ... Marra, M. A. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature Genetics*, 42(2), 181–5. <http://doi.org/10.1038/ng.518>

Motulsky, A. G., & Qi, M. (2006). Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 7(2), 169–70. <http://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0169>

Naylor, T. L., Tang, H., Ratsch, B. A., Enns, A., Loo, A., Chen, L., ... Stegmeier, F. (2011). Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Research*, 71(7), 2643–53. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2525>

Niemann, C. U., & Wiestner, A. (2013). B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Seminars in Cancer Biology*, 23(6), 410–421. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.09.001>

Nieters, A., Conde, L., Slager, S. L., Brooks-Wilson, A., Morton, L., Skibola, D. R., ... Skibola, C. F. (2012). PRRC2A and BCL2L1 gene variants influence risk of non-Hodgkin lymphoma: results from the InterLymph consortium. *Blood*, 120(23), 4645–4648. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-05-427989>

- Nogai, H., Dörken, B., & Lenz, G. (2011). Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*.
- Novak, A. J., Asmann, Y. W., Maurer, M. J., Wang, C., Slager, S. L., Hodge, L. S., ... Cerhan, J. R. (2015). Whole-exome analysis reveals novel somatic genomic alterations associated with outcome in immunochemotherapy-treated diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer Journal*, 5(8), e346. <http://doi.org/10.1038/bcj.2015.69>
- Oflazoglu, E., & Audoly, L. P. (2010). Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology. *mAbs*, 2(1), 14–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2828574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ott, G., Balague-Ponz, O., de Leval, L., de Jong, D., Hasserjian, R. P., & Elenitoba-Johnson, K. S. J. (2009). Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): indolent B cell lymphomas. *Journal of Hematopathology*, 2(2), 77–81. <http://doi.org/10.1007/s12308-009-0037-9>
- Pauwels, P. J., Dumontet, C., Reichert, J. M., Beck, A., Goetsch, L., Corvaia, N., ... Teicher, B. (2012). 7th cancer scientific forum of the Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes: March 20-21, 2012, Lyon, France. *mAbs*, 4(4), 434–44. <http://doi.org/10.4161/mabs.20869>
- Perry, A. M., Alvarado-Bernal, Y., Laurini, J. a., Smith, L. M., Slack, G. W., Tan, K. L., ... Weisenburger, D. D. (2014). MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *British Journal of Haematology*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/bjh.12763>
- Petrich, A. M., Leshchenko, V., Kuo, P.-Y., Xia, B., Thirukonda, V. K., Ulahannan, N., ... Parekh, S. (2012). Akt Inhibitors MK-2206 and Nelfinavir Overcome mTOR Inhibitor Resistance in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 18(9), 2534–2544. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1407>
- Petrich, A. M., Nabhan, C., & Smith, S. M. (2014). MYC-associated and double-hit lymphomas: A review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. *Cancer*, 1–12. <http://doi.org/10.1002/cncr.28899>
- Pfeifer, M., Grau, M., Lenze, D., Wenzel, S.-S., Wolf, A., Wollert-Wulf, B., ... Lenz, G.

- (2013). PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), 12420–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.1305656110>
- Pfreundschuh, M. (2012). Growing Importance of MYC/BCL2 Immunohistochemistry in Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Journal of Clinical Oncology*, 30(28), 3433–3435. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.4729>
- Pfreundschuh, M., Kuhnt, E., Trümper, L., Osterborg, A., Trneny, M., Shepherd, L., ... Murawski, N. (2011). CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *The Lancet. Oncology*, 12(11), 1013–22. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70235-2](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70235-2)
- Pillai, R. K., Sathanoori, M., Van Oss, S. B., & Swerdlow, S. H. (2013). Double-hit B-cell Lymphomas With BCL6 and MYC Translocations Are Aggressive, Frequently Extranodal Lymphomas Distinct From BCL2 Double-hit B-cell Lymphomas. *The American Journal of Surgical Pathology*, 37(3), 323–332. <http://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31826cebad>
- Pirmohamed, M. (2001). Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52(4), 345–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2014592&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Qi, W., Chan, H., Teng, L., Li, L., Chuai, S., Zhang, R., ... Li, E. (2012). Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(52), 21360–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.1210371110>
- Raccor, B. S., Claessens, A. J., Dinh, J. C., Park, J. R., Hawkins, D. S., Thomas, S. S., ... Totah, R. a. (2012). Potential contribution of cytochrome P450 2B6 to hepatic 4-hydroxycyclophosphamide formation in vitro and in vivo. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(1), 54–63. <http://doi.org/10.1124/dmd.111.039347>
- Reichwagen, A., Ziepert, M., Kreuz, M., Gödtel-Armbrust, U., Rixecker, T., Poeschel,

- V., ... Wojnowski, L. (2015). Association of NADPH oxidase polymorphisms with anthracycline-induced cardiotoxicity in the RICOVER-60 trial of patients with aggressive CD20(+) B-cell lymphoma. *Pharmacogenomics*, *16*(4), 361–72. <http://doi.org/10.2217/pgs.14.179>
- Ribrag, V., Koscielny, S., Casasnovas, O., Cazeneuve, C., Brice, P., Morschhauser, F., ... Salles, G. (2009). Pharmacogenetic study in Hodgkin lymphomas reveals the impact of UGT1A1 polymorphisms on patient prognosis. *Blood*, *113*(14), 3307–13. <http://doi.org/10.1182/blood-2008-03-148874>
- Robert, J., Le Morvan, V., Giovannetti, E., & Peters, G. J. (2014). On the use of pharmacogenetics in cancer treatment and clinical trials. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, *50*(15), 2532–43. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.07.013>
- Rodon, J., Dienstmann, R., Serra, V., & Tabernero, J. (2013). Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *10*(3), 143–53. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.10>
- Rodríguez, C., Leskela, S., Zajac, M., Cuadros, M., Alve, J., Moneo, M. V., ... Benitez, J. (2007). Expression of CYP3A4 as a predictor of response to chemotherapy in peripheral T-cell lymphomas, *110*(9), 3345–3351. <http://doi.org/10.1182/blood-2007-02-075036>.The
- Roman, E., & Smith, A. G. (2011). Epidemiology of lymphomas. *Histopathology*, *58*(1), 4–14. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03696.x>
- Roschewski, M., Staudt, L. M., & Wilson, W. H. (2014). Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *11*(1), 12–23. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.197>
- Rossi, D., Brusca, A., La Cava, P., Galimberti, S., Ciabatti, E., Luminari, S., ... Palumbo, G. A. (2015). The genotype of MLH1 identifies a subgroup of follicular lymphoma patients who do not benefit from doxorubicin: FIL-FOLL study. *Haematologica*, *100*(4), 517–24. <http://doi.org/10.3324/haematol.2014.108183>
- Rossi, D., Rasi, S., Di Rocco, A., Fabbri, A., Forconi, F., Ghossein, A., ... Gaidano, G. (2011). The host genetic background of DNA repair mechanisms is an independent predictor of survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, *117*(8), 2405–13.

<http://doi.org/10.1182/blood-2010-07-296244>

- Rossi, D., Rasi, S., Franceschetti, S., Capello, D., Castelli, A., De Paoli, L., ... Gaidano, G. (2009). Analysis of the host pharmacogenetic background for prediction of outcome and toxicity in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP21. *Leukemia*, 23(6), 1118–26. <http://doi.org/10.1038/leu.2008.398>
- Ruan, J., Martin, P., Furman, R. R., Lee, S. M., Cheung, K., Vose, J. M., ... Leonard, J. P. (2011). Bortezomib Plus CHOP-Rituximab for Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 29(6), 690–697. <http://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.1142>
- Rui, L., Schmitz, R., Ceribelli, M., & Staudt, L. M. (2011). Malignant pirates of the immune system. *Nature Immunology*, 12(10), 933–940. <http://doi.org/10.1038/ni.2094>
- Santo, A. E., & Medeiros, R. (2013). Pharmacogenetic considerations for non-Hodgkin ' s lymphoma therapy, 1625–1634.
- Savage, K. J., Harris, N. L., Vose, J. M., Ullrich, F., Jaffe, E. S., Connors, J. M., ... Weisenburger, D. D. (2008). ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood*, 111(12), 5496–5504. <http://doi.org/10.1182/blood-2008-01-134270>
- Schuetz, J. M., Johnson, N. A., Morin, R. D., Scott, D. W., Tan, K., Ben-Nierah, S., ... Gascoyne, R. D. (2012). BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 26(6), 1383–90. <http://doi.org/10.1038/leu.2011.378>
- Scott, D. W., Mottok, A., Ennishi, D., Wright, G. W., Farinha, P., Ben-Neriah, S., ... Gascoyne, R. D. (2015). Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(26). <http://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.2383>
- Sehn, L. H., Donaldson, J., Chhanabhai, M., Fitzgerald, C., Gill, K., Klasa, R., ... Connors, J. M. (2005). Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy

- dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(22), 5027–33. <http://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.137>
- Serpe, L., Canaparo, R., Scordo, M. G., & Spina, E. (2015). Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes in Italian populations. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 30(2), 107–20. <http://doi.org/10.1515/dmdi-2014-0028>
- Shankland, K. R., Armitage, J. O., & Hancock, B. W. (2012). Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, 380(9844), 848–857. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60605-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60605-9)
- Shen, W., Tian, Y., Ran, T., & Gao, Z. (2015). Genotyping and quantification techniques for single-nucleotide polymorphisms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 69, 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.008>
- Shukla, S., Ohnuma, S., & Ambudkar, S. V. (2011). Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Current Drug Targets*, 12(5), 621–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3401946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Slack, G. W., & Gascoyne, R. D. (2011). MYC and aggressive B-cell lymphomas. *Advances in Anatomic Pathology*, 18(3), 219–28. <http://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3182169948>
- Smardova, J. (2011). Prognostic impact of p53 aberrations for R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *International Journal of Oncology*, 39(6), 1413–20. <http://doi.org/10.3892/ijo.2011.1170>
- Smith, S. M., van Besien, K., Karrison, T., Dancey, J., McLaughlin, P., Younes, A., ... Pro, B. (2010). Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(31), 4740–6. <http://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.2813>
- Solal-Celigny, P. (2004). Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood*, 104(5), 1258–1265. <http://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4434>
- Staton, A. D., Koff, J. L., Chen, Q., Ayer, T., & Flowers, C. R. (2015). Next-generation prognostic assessment for diffuse large B-cell lymphoma.

- Su, H. I., Sammel, M. D., Velders, L., Horn, M., Stankiewicz, C., Matro, J., ... DeMichele, A. (2010). Association of cyclophosphamide drug-metabolizing enzyme polymorphisms and chemotherapy-related ovarian failure in breast cancer survivors. *Fertility and Sterility*, 94(2), 645–654. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.034>
- Suarez, F., & Lecuit, M. (2015). Infection-associated non-Hodgkin lymphomas. *Clinical Microbiology and Infection*. <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.07.020>
- Sud, A., Hemminki, K., & Houlston, R. S. (2015). Candidate gene association studies and risk of Hodgkin lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Hematological Oncology*. <http://doi.org/10.1002/hon.2235>
- Sun, Y. L., Patel, A., Kumar, P., & Chen, Z. S. (2012). Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chinese Journal of Cancer*, 31(2), 51–57. <http://doi.org/10.5732/cjc.011.10466>
- Sun, Y.-L., Patel, A., Kumar, P., & Chen, Z.-S. (2012). Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chinese Journal of Cancer*, 31(2), 51–7. <http://doi.org/10.5732/cjc.011.10466>
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. a, Stein, H., ... Vardiman, J. W. (2008). *World Health Organization Classification of Tumours This book and all other volumes of the series can be purchased from : Lyon, France: IARC Press.*
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7), 440–6. <http://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
- Tilly, H., Gomes da Silva, M., Vitolo, U., Jack, A., Meignan, M., Lopez-Guillermo, A., ... Ladetto, M. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 26 Suppl 5(suppl_5), v116–v125. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdv304>
- Townsend, W., & Linch, D. (2012). Hodgkin's lymphoma in adults. *The Lancet*, 380(9844), 836–847. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60035-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60035-X)
- Tzankov, A., Xu-Monette, Z. Y., Gerhard, M., Visco, C., Dirnhofer, S., Gisin, N., ...

- Young, K. H. (2013). Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Modern Pathology*, 27(7), 958–971. <http://doi.org/10.1038/modpathol.2013.214>
- Vaidya, R., & Witzig, T. E. (2014). Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 25(11), 2124–33. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdu109>
- Valera, A., López-Guillermo, A., Cardesa-Salzmán, T., Climent, F., González-Barca, E., Mercadal, S., ... Colomo, L. (2013). MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*, 98(10), 1554–62. <http://doi.org/10.3324/haematol.2013.086173>
- Vaqué, J. P., Martínez, N., Batlle-López, A., Pérez, C., Montes-Moreno, S., Sánchez-Beato, M., & Piris, M. A. (2014). B-cell lymphoma mutations: improving diagnostics and enabling targeted therapies. *Haematologica*, 99(2), 222–31. <http://doi.org/10.3324/haematol.2013.096248>
- Visco, C., Tzankov, A., Xu-Monette, Z. Y., Miranda, R. N., Tai, Y. C., Li, Y., ... Young, K. H. (2013). Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*, 98(2), 255–63. <http://doi.org/10.3324/haematol.2012.066209>
- Wagner, S. D., Ahearne, M., & Ferrigno, P. K. (2011). The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *British Journal of Haematology*, 152(1), 3–12. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08420.x>
- Weinshilboum, R. M., & Wang, L. (2006). Pharmacogenetics and pharmacogenomics: development, science, and translation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 223–245. <http://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162315>
- Weng, L., Zhang, L., Peng, Y., & Huang, R. S. (2013). Pharmacogenetics and pharmacogenomics: a bridge to individualized cancer therapy. *Pharmacogenomics*, 14(3), 315–24. <http://doi.org/10.2217/pgs.12.213>
- Wilson, W. H., Gerecitano, J. F., Goy, A., de Vos, S., Kenkre, V. P., Barr, P. M., ...

- Staudt, L. M. (2012). The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor, Ibrutinib (PCI-32765), Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Interim Results of a Multicenter, Open-Label, Phase 2 Study. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 120(21), 686. Retrieved from <http://abstracts.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/120/21/686>
- Witzig, T. E., Reeder, C. B., LaPlant, B. R., Gupta, M., Johnston, P. B., Micallef, I. N., ... Habermann, T. M. (2011). A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma. *Leukemia*, 25(2), 341–7. <http://doi.org/10.1038/leu.2010.226>
- Wojnowski, L., Kulle, B., Schirmer, M., Schlüter, G., Schmidt, A., Rosenberger, A., ... Hasenfuss, G. (2005). NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation*, 112(24), 3754–62. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.576850>
- Wróbel, T., Mazur, G., Dzietczenia, J., Gebura, K., Kuliczowski, K., & Bogunia-Kubik, K. (2013). VEGF and bFGF gene polymorphisms in Polish patients with B-CLL. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 30(1), 456. <http://doi.org/10.1007/s12032-013-0456-4>
- Xie, Y., Bulbul, M. a., Ji, L., Inouye, C. M., Groshen, S. G., Tulpule, a., ... Siddiqi, I. N. (2014). p53 Expression Is a Strong Marker of Inferior Survival in De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma and May Have Enhanced Negative Effect With MYC Coexpression: A Single Institutional Clinicopathologic Study. *American Journal of Clinical Pathology*, 141(4), 593–604. <http://doi.org/10.1309/AJCPPHMZ6VHF0WQV>
- Xu, Y., Pan, Q., Wang, C., He, C., Su, Z., Guo, X., ... Zhang, X. (2014). Genetic polymorphisms in oxidative stress-related genes are associated with clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving tyrosine kinase inhibitors. *American Journal of Cancer Research*, 4(6), 934–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4266725&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Xu-Monette, Z. Y., Medeiros, L. J., Li, Y., Orlowski, R. Z., Andreeff, M., Bueso-Ramos,

- C. E., ... Young, K. H. (2012). Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood*, *119*(16), 3668–3683. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-11-366062>
- Xu-Monette, Z. Y., Wu, L., Visco, C., Tai, Y. C., Tzankov, A., Liu, W., ... Young, K. H. (2012). Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*, *120*(19), 3986–96. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-05-433334>
- Yang, Y., Shaffer, A. L., Emre, N. C. T., Ceribelli, M., Zhang, M., Wright, G., ... Staudt, L. M. (2012). Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, *21*(6), 723–37. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.024>
- Younes, A. (2015). Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin: Seeing the Forest and the Trees. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. <http://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.9288>
- Yri, O. E., Ekstrøm, P. O., Hilden, V., Gaudernack, G., Liestøl, K., Smeland, E. B., & Holte, H. (2012). Polymorphisms in genes encoding interleukin-10 and drug metabolizing enzymes GSTP1, GSTT1, GSTA1 and UGT1A1 influence risk and outcome in Hodgkin lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, *53*(10), 1934–1944. <http://doi.org/10.3109/10428194.2012.682307>
- Zhao, Y., McLaughlin, D., Robinson, E., Harvey, A. P., Hookham, M. B., Shah, A. M., ... Grieve, D. J. (2010). Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy. *Cancer Research*, *70*(22), 9287–97. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2664>
- Zheng, X., Ding, N., Song, Y., Feng, L., & Zhu, J. (2014). Different sensitivity of germinal center B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells towards ibrutinib treatment. *Cancer Cell International*, *14*(1), 32. <http://doi.org/10.1186/1475-2867-14-32>