Pamela Oliveira de Souza

**POLIMORFISMOS DE ENZIMAS DE FASE 1 E 2 DO
METABOLISMO DE DROGAS EM PACIENTES PORTADORES
DE LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e
da Hemostasia
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo
Bydlowski

São Paulo
2011

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Djalma e Denise, pessoas que tanto amo, que muito me ensinaram e que me ajudaram na conquista deste trabalho.

Ao meu marido, Hernando, por fazer parte da minha vida, pelo seu companheirismo e, acima de tudo, pelo seu amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski por ter aceitado me orientar mesmo sem me conhecer, por sua compreensão, paciência, confiança e por todas as oportunidades proporcionadas.

À Dra. Juliana Pereira por sua importantíssima participação neste trabalho.

À Dra. Débora Levy por sua participação essencial ao desenvolvimento deste trabalho, como também, por sua total compreensão, ajuda, companheirismo, paciência e amizade.

Ao Dr. Felipe Rodrigues Vieira e à Dra. Flávia Xavier pela valiosa colaboração na obtenção das informações de todos os pacientes nos prontuários médicos.

À Linha Akemi Fukuya por sua amizade, companheirismo e carinho em todos os momentos.

À Cleide Menarini Appolonio pela ajuda e pelo carinho.

Aos funcionários, enfermeiras e enfermeiros do Hospital das Clínicas e Hospital Dia que gentilmente contribuíram ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes, que de forma bondosa e generosa, contribuíram à realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório pelo ótimo convívio.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

Aos meus pais, por tudo que fizeram por mim, por me amarem e por estarem sempre presentes na minha vida.

As minhas queridas irmãs, Priscila e Paloma, pelo simples fato de serem minhas irmãs e verdadeiras amigas.

As minhas queridas avós, Iza e Jô, pelo carinho, amor de vó que é muito bom, presença carinhosa e atenciosa da vó Iza na minha vida e eterna saudade da amada vó Jô.

Aos meus cunhados, Adriano e Renan, grandes amigos.

Ao meu marido, Hernando, pela ajuda final à concentração deste trabalho e por termos enfrentado e vencido juntos todas as dificuldades que surgiram.

Ao meu querido e amado cachorrinho, Sulley, fiel amigo e companheiro de todos os momentos, meu filhote, que sempre me traz alegria. Grande presente da minha vida!

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Linfomas	2
1.2 Linfoma não-Hodgkin (LNH)	4
1.3 Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB)	7
1.3.1 Variante centrolástica	8
1.3.2 Variante imunoblástica	9
1.3.3 Variante rico em células T/histiócito	10
1.3.4 Variante anaplásica	11
1.3.5 Subgrupos de linfoma de grandes células B	12
1.3.5.1 Linfoma de grande célula B primário de mediastino	12
1.3.5.2 Linfoma de célula B intravascular	13
1.3.5.3 Linfoma de efusões	14
1.3.6 Parâmetros clínicos	15
1.3.6.1 Idade	15
1.3.6.2 Sintomas B	16
1.3.6.3 Tamanho do tumor	16
1.3.6.4 <i>Performance Status</i> (ECOG)	16
1.4 Tratamento	17
1.5 Farmacogenética	19
1.6 Enzimas de fase I do metabolismo	23
1.6.1 Citocromo P450	23
1.6.1.1 Enzimas CYP3A	24
1.6.1.2 CYP3A5	25
1.6.1.3 CYP2B6	27
1.7 Enzimas de fase II do metabolismo	29
1.7.1 Glutathione-S-Transferase (GST)	30
1.7.1.1 GSTM1	30
1.7.1.2 GSTT1	32
1.7.1.3 GSTP1	32
1.8 Paraoxonase (PON)	33

1.8.1 Paraoxonase 1 (PON1)	34
1.9 NADH quinona oxidase (NQO)	35
1.10 Transportadores ABC	37
1.10.1 Gene de resistência a múltiplas drogas	38
1.10.2 Glicoproteína P	39
1.10.3 Polimorfismos no gene ABCB1	41
2. Justificativa	45
3. Objetivos	46
4. Casuística, Materiais e Método	47
4.1 Casuística	47
4.2 Amostras biológicas	47
4.3 Extração e análise do DNA genômico	48
4.4 Análise por PCR	49
4.4.1 CYP3A5	50
4.4.2 CYP2B6	50
4.4.3 GSTM1 e GSTT1	50
4.4.4 GSTP1	51
4.4.5 PON1	51
4.4.6 NQO1	52
4.4.7 MDR1	52
4.5 Análise por RFLP	53
4.5.1 CYP3A5	53
4.5.2 CYP2B6	53
4.5.3 GSTP1	54
4.5.4 PON1	55
4.5.5 NQO1	55
4.5.6 MDR1	56
4.6 Análise estatística	58
5. Resultado	59
5.1 Genes da família GST	60
5.1.1 GSTM1	60
5.1.2 GSTT1	60

5.1.3 GSTP1	64
5.2 Paraoxonase (PON1)	67
5.3 NADH quinino oxidase (NQO1)	67
5.4 Genes da família CYP56	70
5.4.1 CYP2B6	70
5.4.2 CYP3A5.....	70
5.5 Resistência a múltiplas drogas (MDR1).....	70
5.6 Sobrevida Global (SG)	76
5.6.1 Tratamento	76
5.6.2 IPI	78
5.6.3 Idade	78
5.6.4 Estadiamento	80
5.6.5 ECOG.....	80
5.7 Sobrevida Livre de Doença (SLD)	83
5.7.1 Idade	83
5.7.2 Estadiamento	83
5.7.3 ECOG.....	84
6. Discussão	87
7. Conclusões	103
8. Referências.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

Acil	Enzima de Restrição originado do <i>Staphylococcus sciuri</i>
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino
BsmAI	Enzima de Restrição originado do <i>Acinetobacter lwoffii</i>
Bsrl	Enzima de Restrição originado da espécie <i>Bacillus</i>
CHOP	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina e Prednisona
CYP	Citocromo P
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHL	Desidrogenase Láctica
dNTP	Deoxinucleotídeo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dp	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EC	Estadio Clínico
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group (Performance Status)</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
GELA	Grupo de Estudos de Linfomas em Adultos
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
GST	Glutathione-S-Transferase
HaeIII	Enzima de Restrição do <i>Bacillus subtilis</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da USP
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HHV-8	<i>Human Herpes Virus 8</i>
Hinf I	Enzima de Restrição originado do <i>Haemophilus influenzae</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSHV	<i>Kaposi's Sarcoma Herpes Virus</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer

Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina
IPI	Índice Internacional de Prognóstico
KCL	Cloreto de Potássio
LBIV	Linfoma de Célula B Intravascular
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LDGCB-Med	Linfoma Difuso de Grandes Células B do Mediastino
LE	Linfoma de Efusões
LF	Linfoma Folicular
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LNH	Linfoma Não-Hodgkin
MACOP-B	Metotrexato, Leucovorina, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Predinisona e Bleomicina
M-BACOD	Bleomicina, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Dexametasona, Metotrexato e Leucovorina
Mbol	Enzima de Restrição originado do <i>Moraxella bovis</i>
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MO	Medula Óssea
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NQO	NADH Quinona Oxidase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Oddis Ratio</i>
pb	Pares de Base
PCR	<i>Reaction Chain Polymerase</i>
Pgp	Glicoproteína P
PON	Paraoxonase

Pro	Prolina
ProMACE/ CytaBOM	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Etoposídeo Citosar, Bleomicina, Vincristina, Metotrexato e Predinisona
QAD	Quimioterapia de Alta Dose
RC	Resposta Completa
R-CHOP	Rituximabe, Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Predinisona
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RP	Resposta Parcial
rpm	Rotação por minuto
SDS	Docecil Sulfato de Sódio
Ser	Serina
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SSpl	Enzima de Restrição originado da espécie <i>Sphaerotilus</i>
Styl	Enzima de Restrição originado da <i>Escherichia coli</i>
TAE	Tampão Tris-acetato
TE	Tampão Tris-EDTA
TEN	Tampão Tris-EDTA-NaCl
TGI	Trato Gastrointestinal
Thr	Treonina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade Internacional
Val	Valina
WF	<i>Work Formulation</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto histológico do linfonodo no linfoma não-Hodgkin.....	4
Figura 2. Estadiamento de Ann Arbor	7
Figura 3. Linfoma Difuso de Grandes Células B	9
Figura 4. Linfoma Difuso de Grandes Células B	10
Figura 5. Linfoma Difuso de Grandes Células B	11
Figura 6. Linfoma Difuso de Grandes Células B	12
Figura 7. Esquema generalizado da biodisponibilidade dos fármacos	22
Figura 8. Cromossomo 7, localização 7q21.3-q22.....	25
Figura 9. Cromossomo 7, localização 7q21.1	25
Figura 10. Esquema do <i>splicing</i> alternativo e sua ação na expressão de CYP3A5	26
Figura 11. Cromossomo 19, localização 19q13.2	28
Figura 12. Cromossomo 1, localização 1p13.3	31
Figura 13. Cromossomo 22, localização 22q11.23	32
Figura 14. Cromossomo 11, localização 11q13	33
Figura 15. Cromossomo 7, localização 7q21.3 – 7q22.1	34
Figura 16. Cromossomo 16, localização 16q22.1	36

Figura 17. Cromossomo7, localização 7q21.1	41
Figura 18. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao tratamento recebido	77
Figura 19. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao IPI dos pacientes.....	79
Figura 20. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação à idade dos pacientes	79
Figura 21. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao estadiamento dos pacientes.....	81
Figura 22. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao ECOG.....	82
Figura 23. Tempo de Sobrevida Livre de Doença em dias e a proporção de sobreviventes em relação à idade dos pacientes	85
Figura 24. Tempo de Sobrevida Livre de Doença em dias e a proporção de sobreviventes em relação aos ciclos de tratamento quimioterápico	85
Figura 25. Tempo de Sobrevida Livre de Doença em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao estadiamento dos pacientes.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Polimorfismos, <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos após PCR e/ou RFLP.....	57
Tabela 2. Resposta ao tratamento e os parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	61
Tabela 3. Genótipo GSTM1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	62
Tabela 4. Genótipo GSTT1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	63
Tabela 5. Genótipo GSTP1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	65
Tabela 6. Genótipo GSTP1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	66
Tabela 7. Genótipo PON1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	68
Tabela 8. Genótipo NQO1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	69
Tabela 9. Genótipo CYP2B6 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	71
Tabela 10. Genótipo CYP2B6 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	72

Tabela 11. Genótipo CYP3A5 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	73
--	----

Tabela 12. Genótipo MDR1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	74
--	----

Tabela 13. Genótipo MDR1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB.....	75
--	----

Tabela 14. Relação entre tratamento e sobrevida global dos pacientes.....	77
---	----

Tabela 15. Relação entre estadiamento, número de pacientes e óbitos	81
--	----

Tabela 16. Relação entre ECOG, número de pacientes e óbitos	82
---	----

RESUMO

Oliveira-Souza, P. Polimorfismos de enzimas de fase 1 e 2 do metabolismo de drogas em pacientes portadores de Linfoma Difuso de Grandes Células B. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

Para avaliar a influência dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do CYP2B6, CYP3A5, GSTM1, GSTP1, GSTT1, PON1, NQO1 e MDR1 na resposta ao tratamento com R-CHOP e CHOP, 82 pacientes com Linfoma Difuso de Grandes Células B, sem evidências de infecção por HIV, foram selecionados nesse estudo. Amostras de sangue periférico foram coletadas para extração de DNA. Os SNPs foram analisados por PCR-RFLP. Em relação aos pacientes que apresentaram resposta completa (RC) ao tratamento (70%), 51% foram tratados com R-CHOP. Sobre o tratamento, 50% dos pacientes com RC apresentaram classificação de ECOG 0-1 ($p=0,0193$) e a maioria desses pacientes (41%) não apresentaram envolvimento extranodal ($p=0,0377$). Não houve associação entre os SNPs do CYP2B6, CYP3A5, GSTT1, NQO1 e MDR1 (C3435T) e as variáveis estudadas. Apenas CYP3A5 (sexo $p=0,0519$), GSTM1 (idade $p=0,016$; tratamento $p=0,0372$), GSTP1 (envolvimento extranodal $p=0,0307$), PON1 (sintomas B $p=0,0201$; Bulky $p=0,0148$) e MDR1 C1236T (sexo $p=0,0316$) mostraram associação. Em relação à sobrevida global, apenas tratamento ($p=0,0129$), IPI ($p=0,000342$), idade ($p=0,0155$), estadiamento ($p=0,00281$) e ECOG ($p=0,00869$) apresentaram resultados significantes. Quanto à sobrevida livre de doença (SLD), apenas idade ($p=0,0292$), estadiamento ($p=0,0402$) e ECOG ($p=0,0142$) apresentaram resultados significantes.

Descritores: Linfoma Difuso de Grandes Células B, farmacogenética, polimorfismos de enzimas, polimorfismos de nucleotídeo único, CYP, GST, PON, NQO e MDR.

SUMMARY

Oliveira-Souza, P. Polymorphisms of phase 1 and 2 enzymes of drugs metabolism in patients with Diffuse Large B Cell Lymphoma. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

To evaluated the influence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of CYP2B6, CYP3A5, GSTM1, GSTP1, GSTT1, PON1, NQO1 and MDR1 in the treatment response with R-CHOP and CHOP, 82 patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma, without evidence of HIV infection, were enrolled in this study. Peripheral blood samples were collected for DNA extraction. The SNPs were analyzed by PCR-RFLP. In relation the patients that showed complete response (CR) to the treatment (70%), 51% were treated with R-CHOP. About the treatment, 50% of the patients with CR showed ECOG classification of 0-1 and the most of these patients (41%) did not showed extranodal involvement ($p=0,0377$). There was no association between CYP2B6, CYP3A5, GSTT1, NQO1 and MDR1 (C3435T) SNPs and the variables studied. Only CYP3A5 (gender $p=0,0519$), GSTM1 (age $p=0,016$; treatment $p=0,0372$), GSTP1 (extranodal involvement $p=0,0307$), PON1 (B symptoms $p=0,0201$; Bulky $p=0,0148$) e MDR1 C1236T (gender $p=0,0316$) showed association. In relation to overall survival, only treatment ($p=0,0129$), IPI ($p=0,000342$), age ($p=0,0155$), stadiament ($p=0,00281$) and ECOG ($p=0,00869$) showed significant results. To disease-free survival, only age ($p=0,0292$), stadiament ($p=0,0402$) e ECOG ($p=0,0142$) showed significant results.

Descriptors: Diffuse large B-cell lymphoma, pharmacogenetics, enzymes polymorphisms, single nucleotide polymorphisms, CYP, GST, PON, NQO and MDR.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos (INCA, 2003), como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Estima-se a existência de quase 200 tipos de câncer que se diferenciam pelo órgão de origem e pela capacidade de invadir tecidos vizinhos ou distantes. (Almeida et al., 2005).

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano e representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (World Health Organization, 2002).

Os fatores de risco podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser hereditários (INCA, 2003; Spence e Jonhston, 2001). A maioria dos casos, cerca de 80%, está relacionada ao meio ambiente onde encontramos um grande número de fatores de risco. Entende-se por ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (quando insalubre), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos). As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados

pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer (Ministério da Saúde, 1971). Entretanto, no nosso país, uma representação espaço-geográfico das taxas brutas de incidência para mulheres e homens (100.000 cada) estimadas para o ano de 2002, segundo a região, mostra que é difícil estabelecer uma correlação ambiental que explique as maiores incidências de neoplasia (Almeida et al., 2005).

O câncer é invariavelmente fatal se não for tratado. O diagnóstico precoce e o tratamento imediato são vitais e a identificação de pessoas com risco aumentado de câncer, antes do seu desenvolvimento, é um dos objetivos importantes das pesquisas do câncer (Nussbaum et al., 2002).

1.1 Linfomas

Os linfomas constituem um grupo heterogêneo de distúrbios neoplásicos de células linfóides. Sua heterogeneidade reflete o potencial de transformação maligna em qualquer estágio de diferenciação dos linfócitos B ou T. São tumores sólidos que costumam acometer inicialmente os tecidos linfóides, podendo ocorrer distribuição leucêmica secundária com células de linfoma circulantes no sangue periférico.

Os linfomas representam 3% de todas as neoplasias malignas nos países ocidentais. A doença é mais freqüente em homens e indivíduos brancos, apresenta pequeno pico nos anos pré-adolescentes, declínio durante o final da adolescência e aumento logarítmico com o avanço da idade, sendo a idade mediana de início 50 anos (Rubin e Farber, 2002).

Em 1950, Rappaport dividiu os linfomas pelo padrão de infiltração linfonodal nodular ou difuso e morfologia linfocitária (indiferenciado, bem diferenciado, pouco diferenciado ou histiocítico). Essa classificação foi muito utilizada por ser simples e reprodutível, mas com o avanço da imunologia foi substituída por outras que incluíam o fenótipo celular como critérios classificatórios (Lee et al., 1999).

Na década de 1990, com o melhor conhecimento do sistema imunológico, a possibilidade de identificação de anormalidades genéticas e moleculares específicas, através das modernas técnicas de biologia molecular, foi possível reconhecer tipos específicos de linfomas anteriormente não identificados.

Os diferentes tipos e subtipos de linfomas deixaram de ser classificados exclusivamente pelos seus aspectos histológicos. A maioria dos diferentes linfomas é atualmente reconhecida como “entidades” independentes, definidas por um conjunto de características como: a célula normal que deu origem à neoplásica, o aspecto histológico, a imunofenotipagem, as peculiaridades clínicas e epidemiológicas e os defeitos genéticos e moleculares. O reconhecimento dessas entidades permitirá que no futuro o tratamento seja dirigido especificamente para cada tipo de linfoma (Guimarães, 2004).

1.2 Linfoma não-Hodgkin (LNH)

Os LNH caracterizam-se pela presença de população homogênea de células linfóides neoplásicas, padrões característicos de crescimento das células tumorais na forma de agregados celulares denominados folículos ou nódulos ou em padrão difuso (Figura 1), disseminação imprevisível ou aleatória da doença, manifestação freqüente na forma de distúrbio disseminado ou sistêmico e diferenças clinicopatológicas pronunciadas entre crianças e adultos (Rubin e Farber, 2002).

Figura 1. Aspecto histológico do linfonodo no linfoma não-Hodgkin. À esquerda linfoma nodular e a direita linfoma difuso

Os LNH podem ter origem linfonodal ou extralinfonodal. O primeiro predomina em adultos e o segundo na infância, tendo como sítio extralinfonodal mais comum o trato gastrointestinal (TGI). A manifestação clínica varia com o subtipo, o local de origem e a disseminação. Comumente há linfadenomegalia localizada ou generalizada, podendo haver derrame cavitário, comprometimento de seio paranasal, testículo, mama, medula óssea (MO), síndrome de má absorção intestinal, presença de nódulo, placa e/ou úlcera em pele, sintoma neurológico por infiltração do sistema nervoso central (SNC) e manifestação auto-imune. A presença ou não de sintoma B

(febre, sudorese e emagrecimento acima de 10% do peso corporal em seis meses) é importante no estadiamento e prognóstico (Carbone et al., 1971).

O LNH é a quinta forma mais comum de neoplasia maligna no Brasil e, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2009 a estimativa foi de 9.100 novos casos sendo 4.900 homens e 4.200 mulheres. Quanto ao número de óbitos, em 2007, foram 3.593 casos sendo 2.036 homens e 1.557 mulheres (INCA, 2010).

Nos anos 80, o Instituto Nacional do Câncer Americano propôs a classificação da Working-Formulation (WF) que dividiu clinicamente os LNH em baixo, intermediário e alto grau. Os de baixo grau - linfocítico difuso bem diferenciado, folicular de pequena célula clivada, folicular de pequena e grande célula - foram nomeados de A, B e C, respectivamente. Os de grau intermediário - folicular de grande célula, difuso de pequena célula clivada, difuso de grandes e pequenas células e difuso de grandes células - receberam as letras D, E, F e G, respectivamente. Já os de alto grau - difuso de grande célula tipo imunoblástico, linfoblástico e Burkitt, de H, I e J, respectivamente. Essa classificação foi baseada na resposta ao tratamento e não na definição individual de doença (Working Formulation, 1982). A expectativa era que pacientes de baixo grau seriam incuráveis e tratados sem objetivo curativo e os de grau intermediário e alto teriam potencial de cura e deveriam ser tratados com poliquimioterapia (GROGAN et al., 1997).

O acompanhamento dos LNH de histologia favorável (baixo grau) por longo prazo evidenciou grande variabilidade na curva de sobrevida, sem evidência de platô, embora fossem tratados de maneira semelhante. Por

outro lado, não havia cura para alguns classificados como grau intermediário (histologia desfavorável). Em até 25% dos casos não houve concordância na classificação entre favoráveis e não favoráveis. Assim, essa classificação mostrou-se pouco reprodutível do ponto vista histológico e clínico (GROGAN et al., 1997).

Em 1993, criou-se o Índice Prognóstico Internacional (IPI) que estratificou os LNH em quatro grupos clínicos de prognóstico: risco baixo, intermediário baixo, intermediário alto e alto (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993). Esse índice valoriza o estado funcional do paciente, o estadió clínico, DHL, número de sítio extralinfonodal envolvido e a idade do paciente. Pode ser adaptado para menores de 60 anos, considerando-se o estado funcional, DHL e estadió.

O estadiamento do LNH é determinado pelos critérios de Ann Arbor desenvolvido para Linfoma de Hodgkin (LH). O estadiamento determina a extensão do linfoma, o prognóstico e direciona o tratamento. Nesse sistema, os LNH são divididos em quatro estadios: (I) uma única cadeia de linfonodo acometida, (II) duas ou mais cadeias de linfonodos do mesmo lado do diafragma acometidos, (III) duas ou mais cadeias de linfonodos nos dois lados do diafragma acometidos e (IV) infiltração não contígua de órgãos não linfóides (fígado, SNC, pulmão e MO) (Figura 2) (Carbone *et al.*, 1971).

A presença de sintoma B, o estadió clínico, o volume tumoral, o nível de desidrogenase láctica (DHL), o número de sítios extranodais, idade e a condição clínica do paciente influenciam o prognóstico (Hallack Neto, 2004).

Figura 2. Estadiamento de Ann Arbor sendo I: única cadeia de linfonodo acometidos, II: duas ou mais cadeias de linfonodos do mesmo lado do diafragma acometidos, III: duas ou mais cadeias de linfonodos nos dois lados do diafragma acometidos, IV: infiltração não contígua de órgãos não linfóides

1.3 Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB)

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), subtipo de LNH mais freqüente (Hallack Neto et al., 2006), é uma neoplasia de grandes células linfóides B com tamanho nuclear igual ou excedendo o tamanho normal do núcleo do macrófago ou mais de duas vezes o tamanho normal de um linfócito, com padrão de crescimento difuso (Swerdlow et al., 2008). A idade média ao diagnóstico é 65 anos, embora esse linfoma possa ocorrer em crianças e adultos jovens, sendo homens mais freqüentemente afetados do que mulheres (Zainuddin, 2010).

É uma doença agressiva (Feugier et al., 2005; Pfreundschuh et al., 2006) totalizando quase 40% de todos os LNH (Abramson e Shipp, 2005; Morton et al., 2006). Mesmo apresentando comportamento agressivo, o

LDGCB é uma doença potencialmente curável com 70 a 80% de remissão completa (RC) após quimioterapia ou radioterapia (Zainuddin, 2010).

Embora a Organização Mundial da Saúde (OMS) não os tenha subdividido (Harris et al., 2000), trata-se de uma doença clínica e biologicamente heterogênea. Sua patogênese envolve o acúmulo de múltiplos eventos genéticos em diferentes genes. A presença de mutação em genes da região variável da cadeia pesada das imunoglobulinas (Ig) é comumente utilizada como marcador de origem CG (Stevenson et al., 1998).

Morfologicamente e prognosticamente, o LDGCB representa uma doença de espectro variado. A classificação morfológica tradicional com frequência resulta numa baixa reprodutibilidade e não tem ajudado na predição do resultado (Hunt e Reichard, 2008).

Segundo a OMS, existem quatro variantes morfológicas: centroblastico, imunoblastico, rico em célula T/histiócito e anaplásica. De acordo com a origem, são conhecidas as variantes clínicas linfoma de grandes células B do mediastino (LDGCB-Med), grandes células B intravascular (LBIV) e de efusões (LE) (Carbone et al., 1971).

1.3.1 Variante centroblastica

Variante mais comum apresentando centroblastos que são células linfóides de tamanho médio a grande, oval ou redonda e com núcleo vesicular contendo cromatina fina. Apresentam de duas a quatro membranas

ao redor do nucléolo. O citoplasma geralmente é escasso e anfofílico a basofílico (Figura 3).

Figura 3. Linfoma Difuso de Grandes Células B, variante centroblástica. Observa-se núcleo vesicular com cromatina fina

Em alguns casos o tumor é monomórfico e composto por mais de 90% de centroblastos. Porém, na maioria dos casos o tumor é polimórfico com uma mistura de centroblastos e imunoblastos (Lennert e Feller, 1992; Engelhard et al., 1997). As células tumorais podem apresentar núcleo multilobulado, o que predomina em raros exemplos, especialmente em manifestações do osso e outros sítios extranodais (Swerdlow et al., 2008).

1.3.2 Variante imunoblástica

Mais de 90% das células nessa variante são imunoblastos com nucléolo localizado centralmente e com citoplasma basofílico (Figura 4).

Imunoblastos com diferenciação plasmocitóide também podem estar presente (Swerdlow et al., 2008).

Achados clínicos e/ou imunofenotípicos podem ser essencial na diferenciação desta variante do envolvimento extramedular do linfoma plasmablastico ou de um mieloma de células do plasma imatura (Swerdlow et al., 2008). Na distinção da variante imunoblástica da variante centroblástica tem-se encontrado, geralmente, pior reprodutibilidade intra e interobservador (Harris et al., 1994).

Figura 4. Linfoma Difuso de Grandes Células B, variante imunoblástica. Observa-se nucléolo localizado centralmente

1.3.3 Variante rico em células T/histiócito

O linfoma rico em células T/histiócito (LDGCBR/T) é caracterizado por um número limitado de células B dispersa, grande e atípica num meio

abundante de células T e, freqüentemente, histiócitos (Figura 5). Apresenta padrão de crescimento difuso e menos comumente nodular, ocupando a maior parte do parênquima normal dos linfonodos. As células tumorais estão sempre dispersas e nunca formam agregados (Swerdlow et al., 2008).

O LDGCBR/T geralmente apresenta variação mais pronunciada no tamanho e, em alguns casos, pode parecer com centroblastos ou células mais polimórficas mimetizando células de Reed-Sternberg (Swerdlow et al., 2008).

Figura 5. Linfoma Difuso de Grandes Células B, variante rico em células T/histiócito. Observa-se célula polimórfica mimetizando célula de Reed-Sternberg

1.3.4 Variante anaplásica

Essa variante é caracterizada por células redondas (grande a muito grande), ovais e poligonais com núcleo pleomórfico bizarro que pode se

parecer algumas vezes com células de Hodgkin e/ou de Reed-Sternberg (Figura 6) (Swerdlow et al., 2008). Essas células podem apresentar padrão de crescimento sinusoidal ou então mimetizar o carcinoma indiferenciado (Haralambieva et al., 2000).

Figura 6. Linfoma Difuso de Grandes Células B, variante anaplásica. Observa-se imunopositividade de membrana celular com anticorpo anti-CD30

1.3.5 Subgrupos de linfoma de grandes células B

1.3.5.1 Linfoma de grande célula B primário do mediastino (LDGCB-Med)

O LDGCB-Med é um subtipo de LDGCB localizado no mediastino e de provável origem em célula B da medula do timo com manifestação clínica, imunofenotípica e genética distinta (Carbone et al., 1971). Corresponde a 2% dos LNH, preferencialmente em adultos do sexo

feminino, na terceira ou quarta década de vida. O padrão de expressão é semelhante ao do LH clássico esclerose nodular (Savage, 2006).

A melhor opção de tratamento e o papel da radioterapia de consolidação para LDGCB-Med não estão definidos. Apesar de não haver estudos randomizados comparativos entre esquemas de terceira geração e CHOP, alguns autores preconizam que pacientes com LDGCB-Med devem ser tratados com protocolo de maior intensidade de dose, como MACOP-B (Savage, 2006). Há lugares, como no HC-FMUSP, que utiliza protocolo de tratamento para LDGCB incluindo as indicações de rituximabe, radioterapia e TMOA.

1.3.5.2 Linfoma de célula B intravascular (LBIV)

O LBIV é um subtipo de LDGCB extralinfonodal de apresentação ímpar. Caracteriza-se por proliferação clonal de linfócitos dentro de pequenos vasos com dispersão intraluminal, ausência de infiltração do tecido circundante e envolvimento de linfonodo ou de tecido reticuloendotelial. O diagnóstico é baseado na biópsia do tecido comprometido demonstrando infiltração por células B (DanZuckerman e Hochberg, 2006).

A média de idade de incidência é de 72 anos, com evidência de maior frequência na Ásia, particularmente na variante associada à hemofagocitose. A apresentação clínica depende do órgão comprometido, principalmente SNC e pele. Em razão da variedade de apresentação e de sua raridade o

diagnóstico, em geral, é feito após o óbito (DanZuckerman e Hochberg, 2006).

Em relação ao tratamento, não existem estudos randomizados que indiquem a melhor terapêutica. Em geral, utilizam-se os mesmos protocolos para LDGCB de origem linfonodal (DanZuckerman e Hochberg, 2006).

1.3.5.3 Linfoma de efusões (LE)

O LE é uma neoplasia maligna rara de células B grandes que se apresenta em forma de efusões e sem massa tumoral visível. É mais comum em jovens do sexo masculino e imunocomprometidos, principalmente nos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Está associado ao herpes vírus humano tipo 8 (HHV-8), vírus sarcoma de Kaposi (HSHV) e a altos níveis de citocinas, como IL-6 e IL-10. Alguns pacientes têm história prévia de sarcoma de Kaposi e, raramente, o linfoma associa-se à doença de Castleman multicêntrica (Carbone et al., 1971).

Os locais mais comuns de comprometimento são pleura, pericárdio e cavidade peritoneal. Em geral, apenas uma cavidade está comprometida. Outros locais envolvidos são TGI, tecidos moles e tecidos extralinfonodal. Em geral, há efusões sem linfadenomegalia ou organomegalia (Carbone et al., 1971).

1.3.6 Parâmetros clínicos

Pacientes com LDGCB, geralmente, apresentam massa tumoral de crescimento rápido em um ou múltiplos sítios nodais ou extranodais. Quase metade dos pacientes encontram-se em estágio 1 ou 2 da doença e a maioria são assintomáticos, mas quando os sintomas estão presentes são altamente dependes do sítio de envolvimento (Anon, 1997; Armitage e Weisenburger, 1998).

Parâmetros como idade avançada, mau estado geral, presença de sintomas B, grande massa tumoral, estadio avançado (Ann Arbor III e IV), presença da doença em dois ou mais locais extra-ganglionares e DHL sérica elevada têm sido apontados como indicadores de mau prognóstico.

O IPI classifica os pacientes em 4 grupos de risco baseado em 5 características clínicas: idade (≤ 60 vs > 60), estado geral (ECOG 0-1 vs 2-4), estadio (Ann Arbor I-II vs III-IV), sítio extranodal envolvido (≤ 1 vs > 1) e DHL sérica ($\leq 1x$ vs $> 1x$ normal) (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Project, 1993).

1.3.6.1 Idade

O fato dos idosos tolerarem muitas vezes mal aos esquemas de tratamento convencional faz com que sejam freqüentemente tratados com doses reduzidas, o que diminui a toxicidade do tratamento, mas reduz também sua eficácia. Assim, não é claro que a idade por si só influencie o prognóstico, pois há estudos que o consideram e outros que demonstraram

que se ajustar a idade às outras causas de morte, aquela não constitui fator de prognóstico independente (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Project, 1993).

1.3.6.2 Sintomas B

São apontados como indicadores de pior prognóstico, no entanto quando é feita a análise multivariada de diversos indicadores prognósticos, estes sintomas perdem muito do seu valor preditivo, pois não são fatores de prognóstico independentes (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Project, 1993).

1.3.6.3 Tamanho do tumor

A importância prognóstica do tamanho da massa tumoral tem sido considerada em muitos trabalhos, no entanto a forma como essa massa tumoral é avaliada é muito variável e nem sempre fácil. Muitos autores analisam apenas as dimensões da maior área envolvida pelo linfoma e consideram volumosas (“*bulky*”) as massas com mais de 5-10 cm. Outras valorizam o número de áreas ganglionares e/ou extra-ganglionares envolvidas (Medeiros e Jaffe, 1996).

1.3.6.4 Performance Status (ECOG)

A classificação de ECOG é uma denominação atribuída às condições gerais do paciente. Essa classificação é atribuída a cinco tipos de condições

do paciente: 0 que determina um paciente plenamente ativo, sem restrição; 1 paciente com atividade física extenuante limitada, mas capaz de desenvolver atividades leves; 2 paciente capaz de realizar cuidados pessoais, mas incapaz de vida produtiva e acamado em <50% do dia; 3 paciente capaz somente de cuidados pessoais limitados, confinado a cama ou poltrona >50% do dia; 4 paciente completamente incapaz, não pode realizar cuidados pessoais e totalmente confinado a leito ou poltrona.

1.4 Tratamento

Para melhor discussão do tratamento dos LDGCB, os pacientes devem ser divididos em grupos com doença localizada, disseminada e com recidivas após remissão inicial. Entretanto, todos os pacientes tratados com intenção curativa devem receber poliquimioterapia contendo antraciclina (Fisher et al., 1993).

Os protocolos de tratamento para LDGCB combinam alquilantes, alcalóide da vinca e corticóides (McKeelvey et al., 1976). Embora o LDGCB seja potencialmente curável com a quimioterapia convencional baseada em antraciclina, a variabilidade na resposta é freqüentemente observada (Abramson e Shipp, 2005; Morton et al., 2006) enfatizando a diversidade dessa doença (Hunt e Reichard, 2008).

O potencial de cura com quimioterapia isolada em linfoma agressivo disseminado foi evidenciado por Levitt et al. (1972) e DeVita et al. (1975) no início da década de 1970. Ambos utilizaram o esquema CHOP e obtiveram

altas taxas de remissão e longa SLD. A partir desses dados, esse esquema tornou-se, rapidamente, o protocolo de escolha para linfoma agressivo. Foram testados, posteriormente, vários esquemas denominados terceira geração (M-BACOD, MACOP-B, ProMACE/CytaBOM), que se mostraram promissores em estudos randomizados. No entanto, quando testados em estudos randomizados, verificou-se que os resultados eram semelhantes aos obtidos com CHOP, mas com maior toxicidade (Fisher et al., 1993).

Atualmente a primeira linha de tratamento padrão é a combinação de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e predinisona (CHOP) ou um regime equivalente combinado com rituximabe (R-CHOP) (Feugier et al., 2005; Pfreunschuh et al., 2006), anticorpo monoclonal anti-CD20 (Coiffier et al., 2002), que se liga aos receptores CD20 dos linfócitos B inibindo o crescimento e ativando mecanismos de destruição dessas células. Essa combinação resulta em taxa de remissão completa (RC) de 75-80% e sobrevida livre de progressão (SLP) de 50-80% em 3-5 anos (Feugier et al., 2005; Pfreunds Schuh et al., 2006).

Em 2000, o Grupo de Estudos de Linfomas em Adultos (GELA) demonstrou taxas de progressão, recidiva ou morte de 43% para pacientes com idade superior a 60 anos utilizando CHOP e rituximabe e de 61% para o grupo que recebeu apenas CHOP. Em cinco anos, 50% dos pacientes com R-CHOP estavam livres de evento e apenas 20% no grupo CHOP. SLD e SG também foram favoráveis à combinação R-CHOP com p de 0,00031 e 0,0073, respectivamente. O benefício do R-CHOP foi observado em todos os

grupos de risco do IPI, principalmente nos casos Bcl-2+, sem toxicidade adicional para o R-CHOP (Coiffier et al, 2002).

Pacientes refratários primários (não responsivos) ou com recidiva após esquemas com adriamicina, quando tratados com combinação de diferentes fármacos utilizados inicialmente (esquema de resgate), têm 20% a 40% de probabilidade de obterem RC, mas com sobrevida global (SG) em 5 anos inferior a 10%. Quando os pacientes quimiossensíveis são submetidos à consolidação com quimioterapia em alta dose (QAD) e restituição com célula tronco autóloga, a SG eleva-se para 46% (Philip et al., 1995).

1.5 Farmacogenética

A farmacogenética estuda as variações genéticas que alteram a habilidade do corpo no que diz respeito a absorver, transportar, metabolizar ou excretar fármacos e/ou seus metabólitos.

Em termos mais amplos e mais úteis, a farmacogenética inclui qualquer variação geneticamente determinada em resposta aos fármacos (Nussbaum et al., 2002), ou seja, associa-se às características de indivíduos e populações com base em suas respostas biológicas ao tratamento com fármacos, pretendendo prever a eficácia e a toxicidade em relação às influências dos fatores genéticos.

Arno Motulski, em 1950, foi quem primeiramente propôs que a herança de fatores adquiridos poderia explicar as diferenças individuais na eficácia dos fármacos e na ocorrência de efeitos colaterais.

O papel da variação genética, comum na determinação da susceptibilidade individual dentro da população, é amplamente reconhecido. Mesmo que as diferenças individuais de resposta ao fármaco possam ser resultantes de idade, sexo, doença ou interação medicamentosa, os fatores genéticos também as influenciam.

A promessa da farmacogenética reside em seu potencial para identificar o melhor fármaco e a melhor dose para cada paciente promovendo, desta forma, a estratificação de indivíduos dentro de grupos de resposta terapêutica de acordo com o seu genótipo, permitindo uma maior precisão no tratamento individualizado (Abraham et al., 2006).

Por meios de novas tecnologias, a farmacogenética irá melhorar significativamente a precisão na avaliação do risco de um determinado fármaco, pois será capaz de identificar subpopulações sensíveis a ele e de permitir a criação de um perfil de risco para cada indivíduo com base em sua composição genética determinando inclusive potenciais reações tóxicas a fármacos que sejam característicos do indivíduo. É o que vem sendo denominada “medicina personalizada”.

A medicina personalizada foi definida recentemente como a utilização da informação acerca da constituição genética de uma pessoa para determinar estratégias para detecção, tratamento ou prevenção de doenças. Assim, na terapêutica personalizada, a avaliação da informação genética de cada paciente é essencial.

Uma significativa heterogeneidade na eficácia e toxicidade dos agentes quimioterápicos é observada dentro das populações com câncer

(Kalow et al., 1998; Evans e Relling, 1999). Uma ampla variedade de fatores pode influenciar na disposição e resposta ao fármaco como idade, origem étnica, sexo, dieta, biologia do tumor, função do órgão e diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco devido aos polimorfismos nas enzimas de metabolização, transportes e alvos do fármaco (Abraham et al., 2006).

Desta forma, um fator de crescente importância à farmacogenética é o estudo dos polimorfismos nos alvos dos fármacos, incluindo os receptores de superfície celular, proteínas alvo e genes envolvidos na farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Por exemplo, a eficácia diminuída do fármaco poderia relacionar-se à indução das enzimas necessárias ao seu metabolismo ou transporte (Deeken et al., 2007).

Após a administração do fármaco, ele é absorvido e distribuído pelo organismo. No seu sítio de ação irá interagir com alvos, como receptores e enzimas, será metabolizado e excretado. O metabolismo geralmente converte fármacos em metabólitos que são mais hidrossolúveis e, assim, mais facilmente excretados. Pode também converter pró-fármacos em compostos terapeuticamente ativos ou resultar na formação de metabólitos tóxicos.

Classificam-se as vias de metabolismo de fármacos em reações de fase I (Figura 7) que incluem os processos de oxidação, redução e hidrólise, e em reações de fase II (Figura 7) que englobam fundamentalmente as reações de conjugação (acetilação, glucoronidação, sulfatação e metilação). Virtualmente todas essas vias de metabolismo de fármacos podem,

eventualmente, apresentar variações genéticas, os denominados polimorfismos.

Figura 7. Esquema generalizado da biodisponibilidade dos fármacos

Os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), alteração de única base no DNA, é o tipo de polimorfismo freqüentemente estudado devido a sua potencial capacidade de interferir em diversos aspectos da atividade e estabilidade dos genes e suas proteínas (Ojopi e Neto, 2002) podendo, desta forma, alterar o metabolismo dos fármacos modificando sua eficácia e toxicidade.

Os perfis dos SNPs de um indivíduo podem ser usados na determinação de “perfis de risco” ou em estudos de farmacogenética e no prognóstico clínico, mas para isso é necessário conhecimentos de

associação entre dezenas ou centenas de alelos de predisposição (Ojopi e Neto, 2002).

1.6 Fase I do metabolismo enzimático

A biotransformação de fármacos na fase I do metabolismo ocorre através de reações de oxidação, redução e/ou hidrólise. A principal reação da fase I é a oxidação, catalisada principalmente pelas enzimas da família citocromo P450. Os produtos oriundos da fase I, já mais polares, portanto mais hidrossolúveis, podem ser excretados ou ainda sofrer biotransformação na fase II.

1.6.1 Citocromo P450

O sistema citocromo P450 é composto por diversas isoenzimas, codificadas pela superfamília do gene CYP (Testa, 1995). Esta superfamília é dividida em famílias e subfamílias sendo que, em humanos, as principais subfamílias envolvidas com o metabolismo de fármacos são as CYP 1A, 2A-F e 3A.

São as mais importantes enzimas atuantes na fase I do metabolismo de fármacos, compreendendo uma grande família de enzimas relacionadas, porém distintas, que diferem entre si na seqüência de aminoácidos, na regulação por agentes indutores e inibidores e na especificidade das reações que elas catalisam (Rang et al., 2001).

As enzimas da família CYP são expressas em vários tecidos, mas apresentam maior atividade no fígado (Deeken et al., 2007) estando envolvidas na fase I do metabolismo hepático, ou seja, atuam no metabolismo oxidativo de vários substratos endógenos e em mais de 90% de todos os fármacos (Rang et al., 2001; Deeken et al., 2007).

O polimorfismo genético dessas enzimas pode resultar em diferenças na farmacocinética e nos efeitos terapêuticos dos fármacos metabolizados por elas. Muitos fármacos usados na oncologia são metabolizados pelas enzimas da família citocromo P450 (Deeken et al., 2007).

Variações genéticas nas enzimas CYP, como os SNPs, alteram o metabolismo dos fármacos, sua eficácia e toxicidade sendo clinicamente significantes (Deeken et al., 2007).

1.6.1.1 Enzimas CYP3A

A subfamília de enzimas CYP3A é a maior do citocromo P450 quanto ao seu nível de expressão no fígado, aproximadamente 30% ou mais do total da proteína CYP (Shimada et al., 1994). Há quatro membros da família: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43 (Figura 8). As enzimas predominantes na subfamília em termos de farmacogenética e com papel mais significante são as CYP3A4 e CYP3A5 (Deeken et al., 2007).

Figura 8. Cromossomo 7, localização 7q21.3-q22

1.6.1.2 CYP3A5

A CYP3A5 é a principal contribuidora da atividade CYP3A hepática total ou intestinal (Kuehl et al., 2001) e o seu gene está localizado no cromossomo 7q21.1 (Figura 9). Sua expressão é polimórfica com níveis facilmente detectáveis em aproximadamente 30% do fígado e níveis baixos a indetectáveis em outros órgãos (Wrighton et al., 1990).

Figura 9. Cromossomo 7, localização 7q21.1

O SNP A6986G, no íntron 3 do gene CYP3A5 (CYP3A5*3), resulta na transcrição de um mRNA aberrante que codifica uma proteína (CYP3A5) truncada com pouca ou nenhuma atividade (Figura 10). Mais de 90% dos caucasianos e 30% dos afro-americanos são homozigotos para essa variante e, assim, deficientes na sua expressão (Hustert et al., 2001; Kuehl et al., 2001).

Figura 10. Esquema do *splicing* alternativo e sua ação na expressão de CYP3A5 (adaptado de Lamba JK, 2002)

Dados são limitados com relação à atividade da CYP3A5 quanto ao grande número de substratos CYP3A4 já conhecidos. Entretanto, a CYP3A4 está envolvida no metabolismo da maioria dos fármacos anti-câncer, e polimorfismos de CYP3A5 poderiam afetar a farmacodinâmica dos fármacos que são metabolizados pelas duas enzimas. Também deve ser lembrado que a família citocromo P450 metaboliza muitos outros fármacos que os pacientes podem estar usando, concomitantemente, com a quimioterapia (Yvonne et al., 2002). Alterações na farmacodinâmica desses fármacos pode também afetar o bem estar dos pacientes e potencialmente a eficácia dos agentes quimioterápicos usados simultaneamente (Abraham et al., 2006).

Um interessante exemplo é quanto ao metabolismo dos fármacos do grupo ciclofosfamida realizado por essas enzimas. Através de análises do DNA de pacientes com câncer de mama, por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), foi identificado um SNP nos alelos CYP3A4 e CYP3A5 correlacionado com a diminuição do metabolismo da ciclofosfamida e diminuição significativa da sobrevida dos pacientes quando comparado aos

pacientes que não apresentaram esses alelos polimórficos (Hutchinson, 2001).

Em relação ao efeito da CYP3A4 e CYP3A5, na explicação da variação interindividual no metabolismo de fármacos, muito ainda precisa ser pesquisado e evidências conflitantes precisam ser reconsideradas. Questões sem respostas, incluindo se o polimorfismo na CYP3A5 tem maior impacto na explicação da variabilidade na disposição do fármaco do que o polimorfismo na CYP3A4 e se influências como o estado de saúde e idade do paciente explicariam melhor a variabilidade na expressão e atividade da CYP3A4 (Deeken et al., 2007) ainda precisam ser esclarecidos.

Desta forma, ainda não está claro qual variante apresenta um papel crítico na explicação da variação interindividual no metabolismo dos substratos dos fármacos (Deeken *et al.*, 2007).

1.6.1.3 CYP2B6

A enzima CYP2B6, expressa no fígado e em tecidos extra-hepáticos (Ekins et al., 1998), cujo gene codificante localiza-se no cromossomo 19q13.2 (Figura 11) (Deeken et al., 2007), também apresenta importante papel à farmacogenética.

São conhecidos mais de 70 fármacos completamente, ou parcialmente, metabolizados por esta enzima (Ekins et al., 1998). A sua atividade enzimática pode variar até 100 vezes entre os indivíduos (Yamano

et al., 1989) e as mulheres apresentam maior expressão hepática desta enzima, incluindo alta expressão de mRNA (Lamba et al., 2003).

Figura 11. Cromossomo 19, localização 19q13.2

A CYP2B6 está envolvida no metabolismo dos quimioterápicos como a ciclofosfamida e a ifosfamida (Deeken et al., 2007). Schimidt et al. (2001) mostraram diferenças na expressão da CYP2B6 sexo-dependente no metabolismo da ifosfamida *in vitro*. Os microsossomos do fígado, nas mulheres, tiveram duas vezes mais N-decloroetilação da ifosfamida do que nos homens. Mais investigação clínica é preciso para avaliar completamente qual o impacto da variação genética e do sexo na CYP2B6 que apresenta eficácia e toxicidade da ciclofosfamida e ifosfamida (Deeken et al., 2007).

Até agora quarenta SNPs já foram identificados o que leva a 37 diferentes variantes alélicas, variantes as quais constituem CYP2B6*2 a CYP2B6*25 (Deeken et al., 2007). Estas variantes afetam tanto a função como a expressão das enzimas. Kirchheiner et al. (2003) descobriram que a variante CYP2B6*4, contendo o SNP A785G, apresenta atividade enzimática aumentada nos indivíduos heterozigotos (*1/*4) quando comparado aos indivíduos que não apresentam a alteração. Ambas as CYP2B6*4 e CYP2B6*6 carregam a variante A785G. Uma variante adicional (G516T),

também encontrada no alelo CYP2B6*6, mostrou diminuição na expressão da proteína (Ariyoshi et al., 2001; Xie et al., 2003).

Lang et al. (2001) relataram que o polimorfismo encontrado nas variantes alélicas CYP2B6*5 e CYP2B6*7 levam a diminuição da expressão da proteína em indivíduos homozigotos e heterozigotos. Lamba et al. (2003) encontraram uma correlação entre este SNP e a diminuição da atividade em mulheres, mas não em homens. Lang et al. (2004) também encontraram, *in vitro*, diminuição da expressão ou função nas variantes CYP2B6*11, *12, *13, *14 e *15, um achado que precisa ser validado *in vivo*. Klein et al. (2005) encontraram expressão diminuída, *in vitro*, nas variantes CYP2B6*18, *19, *20 e *21 e Zukunft et al. (2005) encontraram um SNP no TATA box (-C82T) que leva, *in vitro*, ao aumento da expressão e função da enzima.

1.7 Fase II do metabolismo enzimático

A fase II do metabolismo de fármacos é realizada por enzimas que conjugam substâncias ao substrato para torná-lo mais solúvel em água, permitindo sua eliminação pelo trato renal e biliar. Algumas destas enzimas de importância à farmacogenética são: Glutathione-S-Transferase (GST), NADH Quinona Oxidase (NQO) (Abraham et al., 2006), e a Paraoxonase (PON) (Nebert et al., 1996; Pereira et al., 1997; Kerridge et al., 2002).

1.7.1 Glutathione-S-Transferase (GST)

A GST é uma família de enzimas que estão envolvidas na destoxificação de vários fármacos, inclusive os agentes quimioterápicos (Kelada *et al.*, 2003), através da conjugação da glutathione a moléculas eletrofílicas e produtos oxidativos (Abraham *et al.*, 2006).

As GSTs foram classificadas em quatro classes de enzimas citosólicas: GSTA, GSTM, GSTP, GSTT e uma enzima microsomal com mais subdivisões (Mannervik *et al.*, 1992). Existem também seis principais subclasses de GST: GST α , GST π , GST μ , GST ω , GST θ e GST ζ . Várias destas subclasses têm sido vinculadas ao risco aumentado de câncer como, também, aos mecanismos de resistência a drogas (Abraham *et al.*, 2006).

Polimorfismos dentro dos genes GSTM1, GSTT1 e GSTP1 têm sido associados a várias malignidades, incluindo as leucemias (Krajinovic *et al.*, 2000; Rollinson *et al.*, 2000; Yuille *et al.*, 2002) e os linfomas Hodgkin (Hohaus *et al.*, 2003).

1.7.1.1 GSTM1

O gene GSTM1, localizado no cromossomo 1p13.3 (Figura 12) (De Jong *et al.*, 1991; Zhong *et al.*, 1992; Pearson *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1993), é um gene polimórfico (Cotton *et al.*, 2000) responsável pela metabolização de uma ampla variedade de compostos tóxicos e mutagênicos, incluindo alguns que surgem da fase I do metabolismo realizado pelas enzimas CYP450 (Lemos *et al.*, 1999). Este locus apresenta pelo menos três

variantes alélicas, GSTM1*A e *B, as quais diferem entre si por uma única base no éxon 7, e o GSTM1*0, na qual todo o gene é deletado. Os alelos podem se combinar formando genótipos heterozigotos (GSTM1*A*B, GSTM1*A_ e GSTM1*B_) e homozigotos (GSTM1*A*A, GSTM1*B*B ou GSTM1_) (Fryer et al., 1993; Pearson et al., 1993; Zhong et al., 1993b). Indivíduos homozigotos para GSTM1*0 (genótipo nulo) não expressam a proteína e representam a maioria da população caucasiana, aproximadamente 50% (Seidgard et al., 1988). Desta maneira, a ausência deste gene pode causar maior acúmulo de metabólitos reativos no organismo, aumentando a probabilidade de interação com as macromoléculas celulares e iniciação do processo tumoral (Losi-Guembarovski e Cólus, 2001).

Figura 12. Cromossomo 1, localização 1p13.3

O genótipo GSTM1 nulo já foi associado ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres como o de pulmão (Hirvonen et al., 1993), coloretal (Zhong et al, 1993a, Deakin et al., 1996), bexiga (Lin et al., 1994; Santella et al., 1995; Johns e Houlston, 2000) cólon, mama (Mcwilliams et al., 1995), adenocarcinoma de cólon, estômago (Strange et al., 1991) e carcinoma de cavidade oral (Sato et al., 1999).

1.7.1.2 GSTT1

O gene GSTT1, localizado no cromossomo 22q11.23 (Figura 13) (Pemble et al., 1994), também apresenta susceptibilidade ao câncer como o de bexiga, cólon, pele e estômago, quando há falhas na sua expressão (Hayes e Pulford, 1995, Rebbeck, 1997).

O genótipo nulo (GTT1*0) representa a deleção do gene GSTT1 resultando na perda da atividade enzimática (Franceschi et al., 1991). Um aumento na frequência do genótipo GSTT1 nulo tem sido associado a inúmeras malignidades humanas (Costantini et al., 2001; Staratschek-Jox et al., 2002).

Figura 13. Cromossomo 22, localização 22q11.23

1.7.1.3 GSTP1

O gene GSTP1, localizado no cromossomo 11, locus 11q13 (Figura 14), codifica a maior enzima envolvida na inativação de procarcinógenos relacionados ao tabaco (Soucek et al., 2002). Board (1989) identificou dois polimorfismos no gene GSTP1, no éxon 5 (Ile/Val no códon 105, alelos *1/*2) e no éxon 6 (Ala/Val no códon 114, alelos *1/*3), e mostrou que estas variantes alélicas dão origem a enzimas com diferentes estabilidades ao calor e afinidade ao substrato (Zamniak et al., 1994).

Esse gene é super expresso em alguns tumores e linhagens de células resistentes a drogas, o que poderia ser um fator significativo na resistência adquirida a certos fármacos anti-câncer (Hayes e Pulford, 1995). No estudo de Ryberg et al. (1997) a frequência do genótipo GSTP1 *2/*2 no éxon 5 foi significativamente maior nos pacientes com câncer de pulmão do que nos indivíduos saudáveis controle.

Figura 14. Cromossomo 11, localização 11q13

1.8 Paraoxonase (PON)

A PON faz parte de uma família de enzimas que contém três genes, PON1, PON2 e PON3, localizados no cromossomo 7, entre q21.3 e q22.1 (Figura 15), e acredita-se estar envolvido na proteção contra o estresse oxidativo (Mackness et al., 1996; La Du et al., 1999; Aviram e Rosenblat, 2004; Mackness et al., 2004; James e Deakin, 2004; NG et al., 2005).

O estresse oxidativo está associado com a peroxidação lipídica nas lipoproteínas e nas células arteriais, incluindo macrófagos (Steinberg, 1997; Maor et al., 2000). Essa “oxidação de macrófagos” possui a capacidade aumentada de converter LDL (lipoproteína de baixa densidade) nativa em LDL oxidada (Fuhrman et al., 1994; Rosenblat e Aviram, 2002).

Figura 15. Cromossomo 7, localização 7q21.3 – 7q22.1

1.8.1 Paraoxonase 1 (PON1)

A PON1 é uma glicoproteína de 43 a 45 kDA sintetizada, principalmente, no fígado e que circula no soro humano associada com a lipoproteína de alta densidade (HDL). É uma esterase dependente de cálcio que hidrolisa um grande espectro de substratos incluindo organofosforatos, éster aril e lactonas (Mackness et al., 1996). Aparentemente, outras classes de substratos existem para a PON1 (Billecke et al., 2000), incluindo um grande número de compostos endógenos e, possivelmente, a PON1 apresente um papel essencial na destoxificação de genotoxinas geradas endogenamente (Kerridge et al., 2002).

Mais de 160 polimorfismos já foram descritos neste gene, alguns em regiões codificadoras, outros em íntrons e regiões reguladoras, que necessitam serem melhor caracterizados e que afetam, provavelmente, a eficiência do *splicing*, a estabilidade do mensageiro ou a eficiência da poliadenilação (Costa et al., 2005).

Estudos epidemiológicos em humanos têm mostrado que polimorfismos na PON1 estão correlacionados a variações nos níveis de lipoproteínas no plasma (Saha et al., 1991; Hegele et al., 1995) e acredita-se que o polimorfismo no gene desta enzima seja um fator chave na

determinação da susceptibilidade ao câncer (Nebert et al., 1996; Pereira et al., 1997; Kerridge et al., 2002).

Um polimorfismo já identificado, quanto à atividade da PON1, refere-se a uma mutação missense que faz com que sua atividade seja parcialmente determinada de modo genético: uma substituição de aminoácido na posição 192, onde há a troca de uma glicina (Q) por uma arginina (R) (A/G: Gln/Arg), originando duas aloenzimas cujas atividades relativas são substrato dependentes (Costa et al., 2005)

Kerridge et al. (2002) demonstraram, pela primeira vez, associação de polimorfismos no gene da PON1 e o risco de desenvolvimento de câncer em humanos. Os autores demonstraram neste trabalho que pacientes apresentando polimorfismo na PON1 e, que sofreram exposição a pesticidas, desenvolveram LNH que foi associado ao importante papel desta enzima na destoxificação de compostos organofosforatos. É possível que o genótipo PON1 Arg/Arg predisponha a hidrólise mais lenta do metabólito intermediário da destoxificação dos organofosforatos, assim, contribuindo ao desenvolvimento do linfoma.

1.9 NADH quinona oxidase (NQO)

As NQOs são oxirredutases que catalisam a redução de dois ou quatro elétrons de diversas quinonas endógenas ou exógenas como, por exemplo, a quinona do alfa-tocoferol vitamina E a menadiona e as quinonas do benzeno, prevenindo a redução de apenas um elétron que levaria à

formação de radicais livres do oxigênio. Esta enzima está envolvida na bioativação por redução de quinonas citotóxicas antitumorais como a mitomicina C, e também tem papel protetor contra a ação mutagênica e carcinogênica das quinonas, seus precursores e metabólitos.

Dois genes (NQO1 e NQO2) já foram descritos, sendo NQO1 o mais importante. O gene NQO1 está localizado no cromossomo 16 (lôcus 16q22.1) (Figura 16) e três possíveis alelos já foram identificados: NQO1*1 funcional, NQO1*2 não funcional e NQO1*3 com atividade reduzida. Em pacientes com câncer, o alelo NQO1*2, polimorfismo de perda de função (Ser/Ser no códon 187) foi associado com risco aumentado de leucemia mielóide relacionada à quimioterapia e, também, à síndrome mielodisplásica (Larson et al., 1999; Wiemels et al., 1999).

Figura 16. Cromossomo 16, localização 16q22.1

O polimorfismo Ser/Ser promove a falta da atividade enzimática e, conseqüentemente, a falha na destoxificação de metabólitos quinona na sua forma reduzida (Moran et al., 1999; Smith, 1999). Desta forma, indivíduos com ausência da atividade de NQO1 estariam altamente predispostos a malignidades devido a sua exposição à procarcinógenos.

1.10 Transportadores ABC

Quanto aos transportadores de membrana, recentes estudos indicaram que a disposição no transporte de fármacos apresenta um papel mais importante do que antes havia sido considerado (Anderle et al., 2004). Eles podem afetar o influxo e efluxo celular, um fato especialmente relevante na terapia do câncer (Deeken et al., 2007). Também, a interação entre os fármacos quimioterápicos e os transportadores nas células e tecidos tem essencial relação com a eficácia da terapia.

Uma das principais famílias de proteínas transportadoras de membrana que influencia a farmacocinética dos fármacos é a ATP-binding cassette (ABC) (Huang e Sadee, 2006). Essas proteínas são codificadas por uma grande família de genes e, até o momento, 49 diferentes genes agrupados em sete subfamílias (ABCA a ABCG), baseado na sequência homóloga, foram identificados no genoma humano (Dean et al., 2001a; Ross e Doyle, 2004).

Os transportadores ABC são responsáveis pelo transporte de diversos substratos através das membranas contra o gradiente de concentração e com hidrólise de ATP (Gottesman et al., 2002). O principal papel fisiológico destes transportadores de membrana é a proteção às células normais e tecidos contra toxinas do meio ambiente, assim, também afetam a disposição dos fármacos anti-câncer no organismo humano e, conseqüentemente, a eficácia e a toxicidade da terapia (Huang, 2007). Elas são expressas no TGI, fígado e rins podendo afetar tanto a absorção quanto a eliminação dos substratos (Deeken et al., 2007).

Os transportadores ABC são freqüentemente associados com a diminuição do acúmulo celular dos fármacos anti-câncer (Gottesman et al., 2002) e, ao lado do seu papel na disposição do fármaco, elas também apresentam importante papel na mediação da quimiosensitividade e resistência das células tumorais (Huang e Sadee, 2006).

Quanto a quimiosensitividade, estes transportadores podem afetá-la por fornecer nutrientes às células tumorais ou por modelar o gradiente eletroquímico através das membranas, desde modo, modificando o caminho da apoptose ou a eficiência de difusão do fármaco ao longo do gradiente eletroquímico nas células (Huang e Sadee, 2006).

1.10.1 Gene de resistência a múltiplas drogas

A resistência a múltiplas drogas (MDR) foi primeiramente observada em cânceres humanos (Gonzalez et al., 2006). A maior parte dos cânceres metastáticos se apresenta resistente à quimioterapia ou, embora responda ao tratamento inicialmente, retorna como um câncer que adquiriu resistência. Esse fenômeno recebeu o nome de resistência a múltiplas drogas por abranger um amplo espectro de agentes citotóxicos descritos na década de 1960 (Kessel et al., 1965; Kessel et al., 1968).

Umas das primeiras características observadas no fenótipo MDR de células cancerosas é a resistência cruzada aos fármacos que não apresentam relação estrutural ou funcional. Também foi observado que células que apresentam o fenótipo de resistência a múltiplas drogas

apresentavam um aumento na expressão da glicoproteína P (Gonzalez et al., 2006).

1.10.2 Glicoproteína P

A glicoproteína P (Pgp) pertence à subfamília ABCB da superfamília ABC, que compreende proteínas que transportam uma ampla variedade de substratos tais como açúcares, aminoácidos, peptídeos, íons inorgânicos, além de diversos compostos hidrofóbicos e metabólicos (Dean et al., 2001a,b). Diversos estudos mostraram que a Pgp age sobre uma grande quantidade de substratos que apresentam como característica comum apenas o fato de serem, em geral, lipofílicos e anfipáticos (Schwab et al., 2003; Marzolini et al., 2004).

São conhecidas várias isoformas da Pgp, classificadas em classes I, II e III. As classes I e II estão relacionadas com a resistência a múltiplas drogas, enquanto a classe III está envolvida no transporte de fosfolipídeos (Van Helvoort et al., 1996; Dey, 2006). Em humanos são descritas duas isoformas, MDR1 (classe I) e MDR3 (classe III) codificadas, respectivamente, pelos genes ABCB1 e ABCB4 (Gottesman e Pastan, 1993).

Embora tenha sido inicialmente detectada em células tumorais, a Pgp também é expressa em células de tecidos normais. No TGI, a primeira barreira de defesa do corpo contra a exposição oral a fármacos e toxinas, a Pgp apresenta um gradiente de expressão crescente do estômago em

direção ao duodeno e está presente na membrana apical do epitélio (Thiebaut et al., 1987; Thörn et al., 2005). Os hepatócitos apresentam a Pgp na superfície canalicular apical e propõe-se que ela faça a excreção para a bile de xenobióticos que não tenham sido eliminados no intestino (Leslie et al., 2005). Nos rins ela é encontrada na superfície apical das células epiteliais dos túbulos proximais, onde medeia a exportação de xenobióticos do sangue para a urina (Thiebaut et al., 1987; Leslie et al., 2005).

A atividade da Pgp no fígado e nos rins parece estar relacionada à eliminação de fármacos (Kusuhara et al., 1998), enquanto no intestino reduz a absorção dos mesmos (Watkins, 1997) além de possivelmente prevenir o acúmulo de bactérias e seus produtos (Leslie et al., 2005). No pulmão está localizada na superfície apical do epitélio dos brônquios e bronquíolos e, também, em macrófagos alveolares (Scheffer et al., 2002). Na placenta é expressa em níveis relativamente altos na borda do sinciciotrofoblasto (Atkinson et al., 2003). Nestes dois últimos tecidos, e também nas barreiras hemato-encefálica, hemato-cérebro-espinhal e hemato-testicular, a Pgp atua na proteção contra xenobióticos, reduzindo a exposição das células e tecidos a substâncias potencialmente tóxicas (Fromm, 2002).

Células do sistema imunológico também expressam Pgp e diversos dados sugerem um papel importante na resposta imunológica, apesar de ainda serem necessárias investigações mais profundas para elucidar em quais processos imunológicos e de que forma a Pgp estaria envolvida (Gonzalez et al., 2006).

Uma vez que a Pgp é um transportador envolvido na eliminação e absorção de um amplo espectro de fármacos, variações em sua atividade ou em sua expressão podem afetar a farmacocinética de medicamentos, reduzindo ou aumentando sua biodisponibilidade (Gonzalez et al., 2006).

A expressão e função destas proteínas exibem uma ampla variabilidade interindividual. Variantes hereditárias (polimorfismos e mutações) nos genes de transporte têm sido descritos como importantes contribuidores na diversidade de respostas aos fármacos (Huang, 2007).

1.10.3 Polimorfismos no gene ABCB1

O gene ABCB1, localizado no cromossomo 7 (7q21.12) (Figura 17), apresenta polimorfismos importantes na determinação da sua expressão e função (Gottesman et al., 2002) afetando a resposta farmacoterápica de várias doenças (Marzolini et al., 2004). Numerosos polimorfismos têm sido identificados e, a maioria, sendo SNPs (Schwab et al., 2003; Pauli-Magnus e Kroetz, 2004; Cascorbi, 2006).

Figura 17. Cromossomo7, localização 7q21.12

Polimorfismos na Pgp foram encontrados tanto em éxons como em íntrons e diversos estudos têm sido realizados em busca de consequências

em relação à expressão e funcionamento desta proteína transportadora (Gonzalez et al., 2006).

Entre os polimorfismos descritos, três têm sido especialmente estudados (C1236T, G2677T/A e C3435T). Em 2000, Hoffmeyer et al. encontraram 15 polimorfismos no gene MDR1 e apenas um deles apresentou correlação com os níveis de expressão e atividade da Pgp: o da posição 3435 (éxon 26), onde ocorreram as variantes alélicas C e T, ambas codificando o aminoácido isoleucina (Ile). Neste trabalho, foi observado que indivíduos T3435T apresentaram menores níveis de expressão e atividade da Pgp em relação aos indivíduos com os demais genótipos. Já os outros dois polimorfismos, mais freqüentemente analisados em estudos farmacológicos e populacionais, são aqueles que apresentaram as maiores freqüências dos alelos variantes, entre os polimorfismos encontrados em éxons, no trabalho realizado por Cascorbi et al., 2001 (Gonzalez et al., 2006).

Cascorbi et al. (2001) estudaram 461 indivíduos na Alemanha. Neste trabalho, foram analisados os alelos C e T na posição 1236 (éxon 12), ambos codificando o aminoácido glicina (Gly), e os alelos G, T e A codificando, respectivamente, alanina (Ala), serina (Ser) e treonina (Thr) na posição 2677 (éxon 21). Recentemente, Wang et al. (2005) observaram que o alelo T na posição 3435 causa uma redução na expressão de mRNA em amostras de fígado humano, sugerindo que isto ocorra devido ao efeito deste alelo na estrutura secundária da molécula, afetando a estabilidade do mRNA. Os autores analisaram combinações genótípicas dos três principais

polimorfismos, C1236T, G2677T/A e C3435T, observando que apenas 3435T está envolvido nesse processo (Gonzalez et al., 2006).

Vários polimorfismos na região promotora e haplótipos foram ligados aos níveis de mRNA no fígado e placenta de amostras da população japonesa (Taniguchi et al., 2003; Takane et al., 2004). Nesses estudos, os haplótipos mostraram associação mais significativa com os níveis de expressão do gene ABCB1 do que com o SNP. Portanto, tem sido sugerido que haplótipos no gene ABCB1 podem ser melhores preditores do efeito funcional das variantes no gene (Lockhart et al., 2003).

Stein et al. (1994) mostraram a variante alélica +103T>C na região promotora do gene ABCB1, que foi identificada em células de osteosarcoma humano. Outro SNP (+8T>C) foi encontrado no promotor do gene em malignidades hematológicas, mas o efeito na função do gene não foi identificado porque foi similarmente encontrada em células normais controle (Rund et al., 1999). Já o SNP G2677T, mencionado anteriormente, apresentou-se expresso, somente em um alelo, em linhagens de célula resistente a droga e amostras de pacientes com linfoma refratário, enquanto nenhuma diferença foi encontrada na expressão alélica em tecidos normais e linfomas malignos não tratados (Mickley et al., 1998).

Embora muitos estudos busquem analisar o efeito dos diferentes alelos destes polimorfismos na resposta aos tratamentos farmacológicos em humanos, nenhuma relação definitiva foi estabelecida ainda. Há controvérsias sobre possíveis efeitos na expressão gênica, na quantidade de

proteína expressa na membrana e mesmo no funcionamento desta proteína (Gonzalez et al., 2006).

Estudos mais detalhados sobre esses polimorfismos são necessários devido à diversidade de resultados e a existência de dados contraditórios. Análises de haplótipos, bem como dos fenótipos resultantes da expressão destes haplótipos, são necessárias para o esclarecimento das incongruências derivadas dos estudos de genótipos individuais (Gonzalez et al., 2006).

Desta forma, o estudo das enzimas de fase I e II do metabolismo de fármacos, como também das proteínas de transporte, se mostram de grande importância à farmacogenética a fim de se consolidar o conhecimento e entendimento dos mecanismos de interações entre fármacos e resposta individual.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, cerca de 50% dos pacientes com Linfoma Difuso de Grandes Células B, subtipo mais freqüente de Linfoma não-Hodgkin, são refratários ou resistentes ao tratamento padrão no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Desta forma, busca-se com este estudo identificar variações genéticas nas proteínas com atividade enzimática (fase I e II do metabolismo) e transportadoras de membrana, pois acreditamos que estas variações genéticas possam influenciar na resposta ao tratamento quimioterápico.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a associação entre os polimorfismos nos genes CYP3A5, CYP2B6, GSTM1, GSTT1, GSTP1, PON1, NQO1 e MDR1 e a variabilidade na resposta farmacológica à quimioterapia com CHOP e R-CHOP de pacientes portadores linfoma difuso de grandes células B.
- Avaliar a associação entre os polimorfismos nos genes CYP3A5, CYP2B6, GSTM1, GSTT1, GSTP1, PON1, NQO1 e MDR1 e os parâmetros clínico de pacientes portadores de linfoma difuso de grandes células B.
- Avaliar a associação entre o tratamento e os parâmetros clínicos de pacientes portadores de linfoma difuso de grandes células B.
- Avaliar a associação entre sobrevida global e sobrevida livre de doença e os parâmetros clínicos de pacientes portadores de linfoma difuso de grandes células B.

4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram avaliados 82 pacientes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B, de ambos os sexos, idades entre 16 e 95 anos e sorologia negativa para o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV). Três pacientes foram excluídos por falta de informações no prontuário médico.

Deste grupo de pacientes avaliados, o primeiro diagnóstico foi realizado em Fevereiro de 1996 e o último em Outubro de 2009.

Todos os pacientes selecionados para o estudo foram informados sobre o protocolo do estudo, previamente aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, somente participaram os que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nesse momento, foram obtidos os dados de sexo, idade, local primário da doença, estadio da doença, IPI, data do início e término do tratamento, terapêutica realizada, acometimento da medula óssea, DHL, sintomas B, bulky e data da última avaliação ou óbito.

4.2 Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com LDGCB, diagnosticados e tratados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Foram obtidos 5 mL de sangue em tubo contendo anticoagulante EDTA.

4.3 Extração e análise do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico, após lise dos eritrócitos, utilizando o método de precipitação com solução saturada de NaCl conforme descrito por Miller et al. (1988) modificado.

As amostras de sangue, colhidas com EDTA, foram lisadas com tampão Tris [Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), sacarose 34 mM, $MgCl_2$ 10 mM] adicionado de Triton X-100 a 1% para obtenção do sedimento de leucócitos após centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos a 20°C. Posteriormente, os leucócitos foram ressuspensos em tampão de lise e centrifugados a 3.000 rpm por 3 minutos a 20°C. Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 500 µL de tampão TEN [Tris-HCl 10 mM (pH 8,2), EDTA 2 mM, NaCl 400 mM] contendo 5µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 3µL de proteinase K (2mg/mL), homogeneizado e incubado por 1 hora a 56°C para completa digestão das células lisadas. Ao sobrenadante foi adicionado 150 µL de NaCl saturado (5M) e centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos a 20°C para promover a sedimentação das proteínas. Por precipitação, o DNA foi recuperado do sobrenadante adicionando-se 600 µL de isopropanol e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Na sequência, o DNA foi lavado com etanol 70%, centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos a 20°C para a remoção do excesso de sal e, em seguida, submetido à secagem por 20 minutos em centrífuga a vácuo modelo Speed Vac AES1010 (Savant Instruments - Farmingdale, NY, EUA) e reidratado em 50 a 300 µL TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM).

A integridade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando tampão TAE [Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM]. O gel com 5 mm de espessura e medindo 7×15 cm e marcado com brometo de etídio (0.5 µg/mL), que se intercala entre os nucleotídeos formando um complexo fluorescente mediante exposição à luz ultravioleta, foi fotodocumentado em sistema de captura de imagem (Thermal Imaging System FTI-500). A quantificação do DNA foi realizada através do quantificador Nanodrop (Nanodrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer).

4.4 Análise por PCR

Para estudar os polimorfismos foi utilizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificação dos fragmentos específicos de cada gene de interesse. Os ensaios de PCR foram otimizados a partir de um protocolo básico com pequenas variações nas concentrações dos componentes da reação, temperatura de hibridização dos *primers* e número de ciclos (30-40 ciclos).

Na composição dos reagentes de PCR foram utilizados: 50-100 ng de DNA genômico, *primers* (Tabela 1) 0,5µM, deoxinucleotídeos (dNTPs) 200-240µM, MgCl₂ 1,5-3mM, 1x tampão de PCR, DNA polimerase 0,5-1,5U, [gelatina 0,01% (CYP3A5) e BSA 0,8µg/µL (PON1)], em volume final de 20µL completado com água DEPC.

4.4.1 CYP3A5

Para estudar o polimorfismo no íntron 3 do gene CYP3A5 (*3C 6986 A/G) que leva a um *splicing* alternativo do transcrito CYP3A5 e ausência da proteína, como descrito por Ron et al. (2002), a PCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos; amplificação por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 7 minutos.

4.4.2 CYP2B6

Para estudar o polimorfismo nos éxons 4 e 5 do gene CYP2B6 (*6 Gln172His 516G/T; *4 Lys262Arg 785A/G e *6 Lys262Arg A/G), respectivamente, como descrito por Guan *et al.* (2006), a PCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; amplificação por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56°C (éxon 4) e a 60°C (éxon 5) por 30 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos; extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.4.3 GSTM1 e GSTT1

Para estudar a presença ou ausência dos genes GSTM1 GSTT1, como descrito por Al-Dayel et al. (2008), as PCRs foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; amplificação por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 59°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos;

extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle interno da reação, *primers* de β -globina (Tabela 1) foram amplificados na mesma reação de PCR. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, em TAE [Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM], corado com brometo de etídio (0.5 μ g/mL) e, como referência, foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb. Os tamanhos dos fragmentos dos genes GSTM1, GSTT1 e β -globina podem ser visualizados na tabela 1.

4.4.4 GSTP1

Para estudar os polimorfismos nos éxons 5 e 6 do gene GSTP1 (*1/*2 Ile105Val e *1/*3 Ala114Val), respectivamente, como descrito por Lu *et al.* (2006), as PCRs foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguida por 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 64°C, 63°C, 62°C, 61°C e 60°C por 30 segundos (ciclos distintos); extensão a 72°C por 30 segundos; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.4.5 PON1

Para estudar os polimorfismos PON1A (Gln192) e PON1B (Arg192) do gene PON1, como descrito por Serrato e Marian (1995), a PCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; amplificação por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto,

anelamento a 61°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.4.6 NQO1

Para estudar o polimorfismo de perda de função (Ser/Ser códon 187) no éxon 6 do gene NQO1, como descrito por Naoe et al. (2000), a PCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 8 minutos; amplificação por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.4.7 MDR1

Para estudar os polimorfismos C3435T e C1236T do gene MDR1, como descrito por Krzysztof et al. (2006) e por Cascorbi et al. (2001), respectivamente, a PCR foi realizada sob as seguintes condições: (C3435T) desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; amplificação por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto e 30 segundos, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos; (C1236T) desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; amplificação por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos.

4.5 Análise por RFLP

A técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi utilizada para se obter melhor diferenciação entre os genótipos de alguns polimorfismos estudados.

4.5.1 CYP3A5

Os alelos do SNP CYP3A5*3C foram identificados por RFLP utilizando-se 1U da enzima de restrição SspI preparada em tampão 1x (10mM Tris-HCl pH7,4, 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mg/mL BSA e 50% glicerol). A digestão enzimática foi realizada por 16 horas a 37°C em volume final de 12µL. Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% em TAE [Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM] corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL) e, como referência, foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb. O tamanho de cada fragmento obtido após a digestão pode ser visualizado na tabela 1.

4.5.2 CYP2B6

Os alelos dos SNPs CYP2B6*6 (Gln172His 516G/T) e CYP2B6*4/*6 (Lys262Arg 785A/G e *6 Lys262Arg A/G) foram identificados por RFLP utilizando-se 1U de enzima de restrição BsrI e 1U de Styl, para os éxons 4 e 5 respectivamente, preparadas em tampão 1x (10mM Tris-HCl pH7,4, 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mg/mL BSA e 50% glicerol). A

digestão enzimática foi realizada por 16 horas a 65°C (éxon 4) e 37°C (éxon 5) em volume final de 12 µL. Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% em TAE [Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM] corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL) e, como referência, foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb. O tamanho de cada fragmento obtido após a digestão pode ser visualizado na tabela 1.

4.5.3 GSTP1

Os alelos dos SNPs GSTP1*1/*2 Ile105Val e GSTP1*1/*3 Ala114Val, foram identificados por RFLP utilizando-se 2,5U de enzima de restrição BsmAI e 1U de Acil, para os éxons 5 e 6 respectivamente, preparadas em tampão 1x (10mM Tris-HCl pH7,4, 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mg/mL BSA e 50% glicerol). A digestão enzimática foi realizada por 16 horas a 37°C em volume final de 12 µL. Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% em TAE [Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM] corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL) e, como referência, foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb. O tamanho de cada fragmento obtido após a digestão pode ser visualizado na tabela 1.

4.5.4 PON1

Os alelos do SNP PON1A (Gln192) e PON1B (Arg192) foram identificados por RFLP utilizando-se 2U da enzima de restrição HinfI preparada em tampão 1x (10mM Tris-HCl pH7,4, 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mg/mL BSA e 50% glicerol). A digestão enzimática foi realizada por 16 horas a 37°C em volume final de 12µL. Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 4% em TAE [Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM] corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL) e, como referência, foi utilizado marcador de tamanho molecular de 50pb. O tamanho de cada fragmento obtido após a digestão pode ser visualizado na tabela 1.

4.5.5 NQO1

Os alelos do SNP (Ser/Ser códon 187) de NQO1 foram identificados por RFLP utilizando-se 2U da enzima de restrição HinfI preparada em tampão 1x (10mM Tris-HCl pH7,4, 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mg/mL BSA e 50% glicerol). A digestão enzimática foi realizada por 16 horas a 37°C em volume final de 12µL. Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% em TAE [Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM] corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL) e, como referência, foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb. O tamanho de cada fragmento obtido após a digestão pode ser visualizado na tabela 1.

4.5.6 MDR1

Os alelos do SNP C3435T e C1236T do gene MDR1 foram identificados por RFLP utilizando-se 2U da enzima de restrição Mbol para C3435T e 1U HaeIII para C1236T preparada em tampão 1x (10mM Tris-HCl pH7,4, 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mg/mL BSA e 50% glicerol). A digestão enzimática foi realizada por 16 horas a 37°C em volume final de 12µL. Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% (C3435T) e 3,5% (C1236T) em TAE [Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM] corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL) e, como referência, foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb (C3435T) e 50pb (C1236T). O tamanho de cada fragmento obtido após a digestão pode ser visualizado na tabela 1.

Tabela 1. Polimorfismos, *primers* e tamanho dos fragmentos após PCR e/ou RFLP

Polimorfismos	Seqüências	Tamanho do fragmento
A6986G (CYP3A5*3C)	5'CATCAGTTAGTAGACAGATGA3' 5'GGTCCAAACAGGGAAGAAATA3'	20, 125, 148** 125, 168***
G516T (CYP2B6*6)	5'TAGGTGACAGCCTGATGTTC3' 5'TCATCCTTTTCTCGTGTGTTCT3'	17, 241, 268** 17, 509***
A785G (CYP2B6*4/*6)	5'TCTCTCCCTGTGACCTGCTAGCT3' 5'TCTTCTCACCTCTCCATCTT3'	56, 116, 171, 297** 56,116,468***
GSTM1	5'CCACATATTCTTGGCCTTC3' 5'AACAAGGGGCATCAAAGAGA3'	215
GSTT1	5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3' 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'	480
B-globina*	5'ACACAACTGTGTTCACTAGC3' 5'CAACTTCATCCACGTTCAACC3'	110
Ile105Val (GSTP1 éxon 5)	5'GTAGTTTGCCCAAGGTCAAG3' 5'AGCCACCTGAGGGGTAAG3'	105, 328** 105, 106, 222***
Ala114Val (GSTP1 éxon 6)	5'GGGAGCAAGCAGAGGAGAAT3' 5'CAGGTTGTAGTCAGCGAAGGAG3'	58, 116, 246** 58, 362***
Gln192Arg (PON1)	5'TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG3' 5'CACGCTAAACCCAAATACATCTC3'	111** 34, 75***
Pro187Ser (NQO1)	5'AGTGGCATTCTGCATTTCTGTG3' 5'GATGGACTTGCCCAAGTGATG3'	85, 188** 85, 151***
C3435T (MDR1)	5'TGATGGCAAAGAAATAAAGC3' 5'CTTACATTAGGCAGTGAATCG3'	76, 130** 206***
C1236T (MDR1)	5'TATCCTGTGTCTGTGAATTGCC3' 5'CCTGACTCACCACACCAATG3'	35, 62, 269** 97, 269***

Nota: * B-globina utilizada como controle interno da reação de PCR para avaliar presença e/ou ausência dos genes GSTM e GSTT

**Tamanho do fragmento para o genótipo homozigoto sem o polimorfismo

***Tamanho do fragmento para o genótipo homozigoto com o polimorfismo

4.6 Análise estatística

Para identificar a independência ou associação entre os parâmetros clínicos avaliados, foram utilizadas tabelas de contingência e o teste exato de Fisher.

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a comparação destas curvas foi realizada pelo teste do qui-quadrado.

Para analisar a resposta como variável independente em função das demais covariáveis, como genótipo, foi considerado um modelo de regressão logística (stepwise).

O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa S-PLUS versão 6.0 para Windows.

5. RESULTADOS

Nesse estudo, 82 pacientes com LDGCB foram avaliados. Algumas análises foram realizadas apenas com 80 ou 81 pacientes devido à ausência de completa informação do paciente necessária a análise.

Dos 80 pacientes avaliados quanto à resposta ao tratamento (completa, parcial ou refratária), 38 (47,5%) eram do sexo masculino e 42 (52,5%) do sexo feminino (Tabela 2).

Ao início do tratamento, os pacientes apresentaram idades entre 16 e 95 anos, mediana de 55 anos (desvio padrão: 16,3 anos). O primeiro diagnóstico foi realizado em Fevereiro de 2006 e o último em Outubro de 2009.

Independentemente do esquema terapêutico adotado, 70% dos pacientes obtiveram RC ao tratamento quimioterápico, tendo sido 12,5% tratados com CHOP e 51,25% com R-CHOP ($p=0,0669$) (Tabela 2).

Os parâmetros clínicos avaliados neste estudo, descritos na tabela 2, que apresentaram associação com significado estatístico quanto à resposta ao tratamento foram ECOG e número de sítios extranodais. De acordo com os dados observados, quanto menor a classificação de ECOG maior o número de pacientes que obtiveram RC (50%) ao tratamento ($p=0,0193$). Também foi observado que a porcentagem de pacientes com RC foi maior (41,25%) no grupo de pacientes que não apresentaram envolvimento de sítio extranodal ($p=0,0377$) (Tabela 2).

5.1 Genes da família GST

5.1.1 GSTM1

Quanto ao polimorfismo do gene GSTM1, foi observada associação com significado estatístico em relação aos parâmetros clínicos idade e tratamento (Tabela 3).

A frequência da presença do polimorfismo foi superior (25,6%) ao genótipo nulo (10,98%) nos pacientes com idade acima de 60 anos ($p=0,0416$). Quanto ao tratamento, foi observado que a quimioterapia com R-CHOP é mais eficiente do que a quimioterapia com CHOP, independentemente do genótipo ($p=0,0372$) (Tabela 3).

5.1.2 GSTT1

Segundo os achados deste estudo, foi observada ausência de associação com significado estatístico quanto à presença ou ausência do polimorfismo do gene GSTT1 em relação aos parâmetros clínicos avaliados (Tabela 4).

Tabela 2. Resposta ao tratamento e os parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB

Variável	Resposta			valor de <i>p</i>
	Completa n (%)	Parcial n (%)	Refratária n (%)	
sexo*				0,3531
feminino	30 (37,50)	4 (5,00)	8 (10,00)	
masculino	26 (32,50)	1 (1,25)	11 (13,75)	
idade (anos) *				0,1573
< 60	40 (50,00)	2 (2,50)	10 (12,50)	
≥60	16 (20,00)	3 (3,75)	9 (11,25)	
tratamento*				0,0669
R-CHOP	41 (51,25)	2 (2,50)	9 (11,25)	
CHOP	10 (12,50)	1 (1,25)	7 (8,75)	
outros	5 (6,25)	2 (2,50)	3 (3,75)	
DHL (micromol/l) *				0,416
≤480	24 (30,00)	2 (2,50)	5 (6,25)	
>480	32 (40,00)	3 (3,75)	14 (17,50)	
estadiamento*				0,12
I	8 (10,00)	2 (2,50)	2 (2,50)	
II	22 (27,50)	-	5 (6,25)	
III	11 (13,75)	3 (3,75)	5 (6,25)	
IV	15 (18,75)	-	7 (8,75)	
ECOG*				0,0193
0 - 1	40 (50,00)	2 (2,50)	13 (16,25)	
2 - 4	16 (20,00)	3 (3,75)	6 (7,50)	
nº sítios extranodal*				0,0377
0	33 (41,25)	-	7 (8,75)	
1	17 (21,25)	4 (5,00)	8 (10,00)	
mais que 1	6 (7,50)	1 (1,25)	4 (5,00)	
origem extranodal*				0,3472
não	34 (42,50)	2 (2,50)	14 (17,50)	
sim	22 (27,50)	3 (3,75)	5 (6,25)	
IPI score*				0,7431
1-2	33 (41,25)	2 (2,50)	10 (12,50)	
3-4	23 (28,75)	3 (3,75)	9 (11,25)	
comprometimento da medula óssea*				1,00
não	51 (63,75)	5 (6,25)	17 (21,25)	
sim	5 (6,25)	-	2 (2,50)	
sintomas B*				0,6414
não	25 (31,25)	2 (2,50)	6 (7,50)	
sim	31 (38,75)	3 (3,75)	13 (16,25)	
Bulky*				0,3142
não	23 (28,75)	2 (2,50)	4 (5,00)	
sim	33 (41,25)	3 (3,75)	15 (18,75)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(2)

Tabela 3. Genótipo GSTM1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo GSTM		valor de <i>p</i>
	Negativo n° (%)	Positivo n° (%)	
sexo			0,8271
feminino	20 (24,39)	23 (28,05)	
masculino	17 (20,73)	22 (26,83)	
idade (anos)			0,0416
< 60	28 (34,14)	24 (29,27)	
≥60	9 (10,98)	21 (25,61)	
tratamento*			0,0372
R-CHOP	25 (30,86)	27 (33,33)	
CHOP	10 (12,35)	8 (9,87)	
outros	1 (1,24)	10 (12,35)	
DHL (micromol/l)*			0,493
≤480	12 (14,81)	19 (23,46)	
>480	24 (29,63)	26 (32,10)	
estadiamento*			0,5501
I	6 (7,40)	6 (7,40)	
II	10 (12,35)	17 (21,00)	
III	8 (9,87)	11 (13,58)	
IV	13 (16,05)	10 (12,35)	
ECOG*			0,5948
0	1 (1,24)	4 (4,94)	
1	24 (29,63)	26 (32,09)	
2	4 (4,94)	2 (2,46)	
3	7 (8,64)	11 (13,58)	
4	1 (1,24)	1 (1,24)	
n° sítios extranodal**			0,1975
0	22 (27,50)	18 (22,50)	
1	10 (12,50)	19 (23,75)	
mais que 1	4 (5,00)	7 (8,75)	
origem extranodal**			0,3533
não	25 (31,25)	25 (31,25)	
sim	11 (13,75)	19 (23,75)	
IPI score**			0,271
1-2	18 (22,22)	27 (33,33)	
3-4	19 (23,46)	17 (20,98)	
comprometimento da medula óssea**			0,2339
não	31 (38,75)	42 (52,50)	
sim	5 (6,25)	2 (2,50)	
sintomas B**			1,00
não	15 (18,75)	18 (22,50)	
sim	21 (26,25)	26 (32,50)	
Bulky**			0,6482
não	12 (36,00)	17 (64,00)	
sim	24 (50,00)	27 (50,00)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

Tabela 4. Genótipo GSTT1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo GSTT		valor de p
	Negativo nº (%)	Positivo nº (%)	
sexo			0,7493
feminino	5 (15,52)	38 (84,48)	
masculino	6 (17,19)	33 (82,81)	
idade (anos)			0,3128
< 60	9 (10,98)	43 (52,44)	
≥60	2 (2,44)	28 (34,14)	
tratamento*			0,8955
R-CHOP	7 (8,64)	45 (55,55)	
CHOP	3 (3,70)	15 (18,52)	
outros	1 (1,24)	10 (12,35)	
DHL (micromol/l)*			1,00
≤480	4 (4,94)	27 (33,33)	
>480	7 (8,65)	43 (53,08)	
estadiamento*			0,4738
I	3 (3,70)	9 (11,11)	
II	4 (4,94)	23 (28,39)	
III	1 (1,24)	18 (22,22)	
IV	3 (3,70)	20 (24,70)	
ECOG*			0,371
0	1 (1,24)	4 (4,94)	
1	7 (8,65)	43 (53,08)	
2	2 (2,47)	4 (4,94)	
3	1 (1,24)	17 (20,98)	
4	-	2 (2,47)	
nº sítios extranodal**			0,9043
0	5 (6,25)	35 (43,75)	
1	4 (5,00)	25 (31,25)	
mais que 1	2 (2,50)	9 (11,25)	
origem extranodal**			0,7387
não	6 (7,50)	44 (55,00)	
sim	5 (6,25)	25 (31,25)	
IPI score**			0,7467
1-2	7 (8,64)	38 (46,92)	
3-4	4 (4,94)	32 (39,50)	
comprometimento da medula óssea**			1,00
não	10 (12,50)	63 (78,75)	
sim	1 (1,25)	6 (7,50)	
sintomas B**			0,3474
não	6 (7,50)	27 (33,75)	
sim	5 (6,25)	42 (52,50)	
Bulky**			0,5155
não	5 (6,25)	24 (30,00)	
sim	6 (7,50)	45 (56,25)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

5.1.3 GSTP1

De acordo com os dados avaliados, foi observada associação com significado estatístico entre o número de sítios extranodais envolvidos e o genótipo homozigoto para o alelo G do polimorfismo A1578G do GSTP1 (éxon 5). O número de pacientes com mais de um sítio extranodal envolvido foi maior nos homozigotos para o alelo G (6,25%) do que nos demais genótipos (3,75%) ($p=0,0307$) (Tabela 5).

Para o polimorfismo C2293T do GSTP1 (éxon 6), foi observada ausência de associação com significado estatístico em relação aos parâmetros clínicos avaliados (Tabela 6).

Tabela 5. Genótipo GSTP1 e parâmetros clínicos dos pacientes com LDGCB

variável	Genótipo GSTP A1578G			valor de <i>p</i>
	AA n° (%)	AG n° (%)	GG n° (%)	
sexo				0,0868
feminino	17 (20,73)	24 (29,27)	2 (2,44)	
masculino	14 (17,07)	17 (20,73)	8 (9,76)	
idade (anos)				0,2203
< 60	16 (19,51)	28 (34,14)	8 (9,76)	
≥60	15 (18,29)	13 (15,86)	2 (2,44)	
tratamento*				0,463
R-CHOP	16 (19,75)	28 (34,57)	8 (9,87)	
CHOP	10 (12,35)	7 (8,64)	1 (1,24)	
outros	4 (4,94)	6 (7,40)	1 (1,24)	
DHL (micromol/l)				0,5603
≤480	10 (12,19)	18 (21,96)	3 (3,66)	
>480	21 (25,61)	23 (28,05)	7 (8,53)	
estadiamento*				0,3437
I	3 (3,70)	9 (11,11)	0	
II	13 (16,05)	11 (13,58)	3 (3,70)	
III	6 (7,41)	11 (13,58)	2 (2,47)	
IV	9 (11,11)	9 (11,11)	5 (6,18)	
ECOG*				0,9145
0	1 (1,24)	3 (3,70)	1 (1,24)	
1	18 (22,22)	25 (30,86)	7 (8,64)	
2	2 (2,46)	3 (3,70)	1 (1,24)	
3	9 (11,11)	8 (9,87)	1 (1,24)	
4	1 (1,24)	1 (1,24)	-	
n° sítios extranodal**				0,0307
0	17 (21,25)	21 (26,25)	2 (2,50)	
1	10 (12,50)	16 (20,00)	3 (3,75)	
mais que 1	3 (3,75)	3 (3,75)	5 (6,25)	
origem extranodal**				0,6526
não	20 (25,00)	25 (31,25)	5 (6,25)	
sim	10 (12,50)	15 (18,75)	5 (6,25)	
IPI score*				0,5765
1-2	18 (22,22)	23 (28,40)	4 (4,94)	
3-4	13 (16,05)	17 (20,98)	6 (7,41)	
comprometimento da medula óssea**				0,6318
não	28 (35,00)	35 (43,75)	10 (12,50)	
sim	2 (2,50)	5 (6,25)	-	
sintomas B**				0,4594
não	15 (18,75)	15 (18,75)	3 (3,75)	
sim	15 (18,75)	25 (31,25)	7 (8,75)	
Bulky**				0,949
não	11 (13,75)	15 (18,75)	3 (3,75)	
sim	19 (23,75)	25 (31,25)	7 (8,75)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

Tabela 6. Genótipo GSTP1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo GSTP C2293T		valor de <i>p</i>
	CC nº (%)	CT nº (%)	
sexo			0,6779
feminino	39 (47,56)	4 (4,88)	
masculino	37 (45,12)	2 (2,44)	
idade (anos)			1,00
< 60	48 (58,54)	4 (4,88)	
≥60	28 (34,14)	2 (2,44)	
tratamento*			0,3604
R-CHOP	49 (60,49)	3 (3,70)	
CHOP	17 (21,00)	1 (1,23)	
outros	9 (11,11)	2 (2,47)	
DHL (micromol/l)			1,00
≤480	29 (35,36)	2 (2,44)	
>480	47 (57,32)	4 (4,88)	
estadiamento*			0,8393
I	12 (14,81)	-	
II	25 (30,86)	2 (2,47)	
III	17 (20,99)	2 (2,47)	
IV	21 (25,93)	2 (2,47)	
ECOG*			0,228
0	5 (6,17)	-	
1	47 (58,02)	3 (3,71)	
2	4 (4,93)	2 (2,47)	
3	17 (20,99)	1 (1,24)	
4	2 (2,47)	-	
nº sítios extranodal**			0,2251
0	37 (46,25)	3 (3,75)	
1	28 (35,00)	1 (1,25)	
mais que 1	9 (11,25)	2 (2,50)	
origem extranodal**			0,6666
não	47 (58,75)	3 (3,75)	
sim	27 (33,75)	3 (3,75)	
IPI score*			0,0834
1-2	44 (54,32)	1 (1,24)	
3-4	31 (38,27)	5 (6,17)	
comprometimento da medula óssea**			1,00
não	67 (83,75)	6 (7,50)	
sim	7 (8,75)	-	
sintomas B**			0,6866
não	30 (37,50)	3 (3,75)	
sim	44 (55,00)	3 (3,75)	
Bulky**			0,4091
não	28 (35,00)	1 (1,25)	
sim	46 (57,50)	5 (6,25)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

5.2 Paraoxonase (PON1)

De acordo com os dados observados, o polimorfismo do PON1 apresentou associação com significado estatístico apenas para sintomas B ($p=0,0201$) e bulky ($p=0,0148$) (Tabela 7).

A porcentagem de pacientes que apresentaram sintomas B foi maior (25%) no grupo de pacientes com genótipo homozigoto para o alelo Q e, para bulky, a maior porcentagem (38,75%) foi no grupo de pacientes com genótipo heterozigoto (Tabela 7).

5.3 NADH quinona oxidase (NQO1)

Para o polimorfismo do NQO1, foi observada ausência de associação com significado estatístico em relação aos parâmetros clínicos avaliados (Tabela 8).

Tabela 7. Genótipo PON1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo PON1 Q192R			valor de <i>p</i>
	QQ n° (%)	QR n° (%)	RR n° (%)	
sexo				0,6613
feminino	14 (17,07)	21 (25,61)	8 (9,75)	
masculino	16 (19,51)	18 (21,96)	5 (6,10)	
idade (anos)				0,6759
< 60	17 (20,73)	26 (31,71)	9 (10,98)	
≥60	13 (15,86)	13 (15,86)	4 (4,87)	
tratamento*				0,3373
R-CHOP	16 (19,75)	28 (34,57)	8 (9,87)	
CHOP	10 (12,35)	5 (6,17)	3 (3,70)	
outros	4 (4,94)	6 (7,41)	1 (1,24)	
DHL (micromol/l)*				0,2868
≤480	13 (16,05)	16 (19,75)	2 (2,47)	
>480	17 (20,99)	23 (28,39)	10 (12,35)	
estadiamento*				0,4715
I	7 (8,65)	5 (6,17)	-	
II	9 (11,11)	12 (14,81)	6 (7,40)	
III	6 (7,40)	11 (13,58)	2 (2,47)	
IV	7 (8,65)	11 (13,58)	5 (6,17)	
ECOG*				0,8622
0	3 (50,00)	2 (37,50)	-	
1	19 (37,66)	23 (44,16)	8 (18,18)	
2	2 (50,00)	3 (41,66)	1 (8,34)	
3	5 (23,81)	10 (57,14)	3 (19,05)	
4	-	1 (100,00)	1 ()	
n° sítios extranodal**				0,7657
0	17 (21,25)	17 (21,25)	6 (7,50)	
1	9 (11,25)	15 (18,75)	5 (6,25)	
mais que 1	3 (3,75)	7 (8,75)	1 (1,25)	
origem extranodal**				0,3614
não	17 (21,25)	26 (32,50)	7 (8,75)	
sim	12 (15,00)	13 (16,25)	5 (6,25)	
IPI score*				0,4119
1-2	19 (23,46)	19 (23,46)	7 (8,64)	
3-4	10 (12,35)	20 (24,69)	6 (7,40)	
comprometimento da medula óssea**				0,3045
não	26 (32,50)	37 (46,25)	10 (12,50)	
sim	3 (3,75)	2 (2,50)	2 (2,50)	
sintomas B**				0,0201
não	9 (11,25)	22 (27,50)	2 (2,50)	
sim	20 (25,00)	17 (21,25)	10 (12,50)	
Bulky**				0,0148
não	14 (17,50)	8 (10,00)	7 (8,75)	
sim	15 (18,75)	31 (38,75)	5 (6,25)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

Tabela 8. Genótipo NQO1 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo NQO1 C609T			valor de p
	CC n° (%)	CT n° (%)	TT n° (%)	
sexo				0,7944
feminino	23 (28,04)	18 (21,96)	2 (2,44)	
masculino	24 (29,27)	14 (17,07)	1 (1,22)	
idade (anos)				0,2096
< 60	33 (40,24)	18 (21,96)	1 (1,22)	
≥60	14 (17,07)	14 (17,07)	2 (2,44)	
tratamento*				0,7643
R-CHOP	30 (37,04)	19 (23,46)	3 (3,70)	
CHOP	11 (13,58)	7 (8,64)	-	
outros	5 (6,17)	6 (7,40)	-	
DHL (micromol/l)*				0,5641
≤480	16 (19,75)	13 (16,05)	2 (2,47)	
>480	30 (37,03)	19 (23,46)	1 (1,24)	
estadiamento*				0,9338
I	8 (9,87)	4 (4,94)	-	
II	16 (19,75)	9 (11,11)	2 (2,47)	
III	11 (13,58)	8 (9,87)	-	
IV	12 (14,81)	10 (12,35)	1 (1,24)	
ECOG*				0,4081
0	3 (3,70)	2 (2,47)	-	
1	27 (33,33)	21 (25,92)	2 (2,47)	
2	5 (6,17)	1 (1,24)	-	
3	11 (13,58)	7 (8,64)	-	
4	1 (1,24)	-	1 (1,24)	
n° sítios extranodal**				0,7093
0	22 (27,50)	16 (20,00)	2 (2,50)	
1	19 (23,75)	9 (11,25)	1 (1,25)	
mais que 1	5 (6,25)	6 (7,50)	-	
origem extranodal**				0,3614
não	31 (38,75)	17 (21,25)	2 (2,50)	
sim	15 (18,75)	14 (17,50)	1 (1,25)	
IPI score*				1,00
1-2	26 (32,10)	17 (20,99)	2 (2,47)	
3-4	21 (25,93)	14 (17,28)	1 (1,23)	
comprometimento da medula óssea**				1,00
não	42 (59,82)	28 (33,93)	3 (6,25)	
sim	4 (6,66)	3 (3,34)	-	
sintomas B**				0,7191
não	19 (23,75)	12 (15,00)	2 (2,50)	
sim	27 (33,75)	19 (23,75)	1 (1,25)	
Bulky**				0,2541
não	15 (18,75)	14 (17,50)	-	
sim	31 (38,75)	17 (21,25)	3 (3,75)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

5.4 Genes da família CYP

5.4.1 CYP2B6

Segundo nossos dados para ambos os polimorfismos do CYP2B6, foi observada ausência de associação com significado estatístico em relação aos parâmetros clínicos avaliados (Tabela 9 e 10).

5.4.2 CYP3A5

De acordo com os dados observados para o polimorfismo do CYP3A5, houve associação com significado estatístico apenas em relação ao sexo ($p=0,0519$) (Tabela 11).

Na tabela 11 pode ser observado que o número de pacientes homozigotos para o alelo G (68,3%) foi mais representativo do que nos demais genótipos, tendo o sexo masculino apresentado número superior (37,81%) ao do sexo feminino (30,49%).

5.5 Resistência a múltiplas drogas (MDR1)

Para o polimorfismo C3435T do MDR1, foi observada ausência de associação entre os parâmetros clínicos avaliados (Tabela 12).

Quanto ao polimorfismo C1236T, foi observada associação apenas em relação ao sexo ($p=0,0316$). Metade dos pacientes (50%) apresentaram genótipo heterozigoto, sendo que 29,27% eram do sexo masculino (Tabela 13).

Tabela 9. Genótipo CYP2B6 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo CYP2B6 G516T			valor de <i>p</i>
	GG n° (%)	GT n° (%)	TT n° (%)	
sexo				0,6971
feminino	25 (30,49)	14 (17,07)	4 (4,88)	
masculino	21 (25,61)	16 (19,51)	2 (2,44)	
idade (anos)				0,369
< 60	26 (31,71)	22 (26,83)	4 (4,87)	
≥60	20 (24,39)	8 (9,76)	2 (2,44)	
tratamento*				0,8286
R-CHOP	31 (38,27)	17 (20,98)	4 (4,94)	
CHOP	9 (11,11)	8 (9,88)	1 (1,24)	
outros	5 (6,17)	5 (6,17)	1 (1,24)	
DHL (micromol/l)*				0,9383
≤480	18 (22,22)	11 (13,58)	2 (2,47)	
>480	27 (33,33)	19 (23,46)	4 (4,94)	
estadiamento*				0,8749
I	7 (8,64)	4 (4,94)	1 (1,24)	
II	18 (22,22)	8 (9,87)	1 (1,24)	
III	9 (11,11)	8 (9,87)	2 (2,47)	
IV	12 (14,81)	9 (11,11)	2 (2,47)	
ECOG*				0,4606
0	2 (2,47)	3 (3,70)	-	
1	31 (38,27)	16 (19,76)	3 (3,70)	
2	2 (2,47)	4 (4,94)	-	
3	9 (11,11)	6 (7,41)	3 (3,70)	
4	2 (2,47)	-	-	
n° sítios extranodal**				0,1495
0	25 (31,25)	13 (16,25)	2 (2,50)	
1	16 (20,00)	12 (15,00)	1 (1,25)	
mais que 1	4 (5,00)	4 (5,00)	3 (3,75)	
origem extranodal**				0,3614
não	29 (36,25)	17 (21,25)	4 (5,00)	
sim	16 (20,00)	12 (15,00)	2 (2,50)	
IPI score*				0,421
1-2	28 (34,57)	15 (18,52)	2 (2,47)	
3-4	18 (22,22)	14 (17,28)	4 (4,94)	
comprometimento da medula óssea**				0,8286
não	40 (50,00)	27 (33,75)	6 (7,50)	
sim	5 (6,25)	2 (2,50)	-	
sintomas B**				0,7252
não	17 (21,25)	13 (16,25)	3 (3,75)	
sim	28 (35,00)	16 (20,00)	3 (3,75)	
Bulky**				0,8722
não	15 (18,75)	12 (15,00)	2 (2,50)	
sim	30 (37,50)	17 (21,25)	4 (5,00)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

Tabela 10. Genótipo CYP2B6 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo CYP2B6 A785G			valor de <i>p</i>
	AA n° (%)	AG n° (%)	GG n° (%)	
sexo				0,6655
feminino	20 (24,39)	17 (20,73)	6 (7,32)	
masculino	18 (21,95)	18 (21,95)	3 (3,66)	
idade (anos)				0,946
< 60	23 (28,05)	23 (28,05)	6 (7,32)	
≥60	15 (18,29)	12 (14,63)	3 (3,66)	
tratamento*				0,5294
R-CHOP	27 (33,33)	18 (22,22)	7 (8,64)	
CHOP	7 (8,64)	10 (12,35)	1 (1,24)	
outros	4 (4,94)	6 (7,40)	1 (1,24)	
DHL (micromol/l)*				0,948
≤480	14 (17,28)	14 (17,28)	3 (3,71)	
>480	24 (29,63)	20 (24,70)	6 (7,40)	
estadiamento*				0,7293
I	5 (6,17)	6 (7,41)	1 (1,24)	
II	16 (19,75)	8 (9,88)	3 (3,70)	
III	8 (9,88)	8 (9,88)	3 (3,70)	
IV	9 (11,11)	12 (14,81)	2 (2,47)	
ECOG*				0,938
0	2 (2,47)	3 (3,70)	-	
1	25 (30,86)	19 (23,46)	6 (7,41)	
2	2 (2,47)	4 (4,94)	-	
3	8 (9,87)	7 (8,64)	3 (3,70)	
4	1 (1,24)	1 (1,24)	-	
n° sítios extranodal**				0,4324
0	21 (26,25)	15 (18,75)	4 (5,00)	
1	13 (16,25)	14 (17,50)	2 (2,50)	
mais que 1	4 (5,00)	4 (5,00)	3 (3,75)	
origem extranodal**				0,3614
não	25 (31,25)	18 (22,50)	7 (8,75)	
sim	13 (16,25)	15 (18,75)	2 (2,50)	
IPI score*				0,479
1-2	24 (29,63)	17 (20,98)	4 (4,94)	
3-4	14 (17,28)	17 (20,98)	5 (6,17)	
comprometimento da medula óssea**				0,6324
não	35 (43,75)	29 (36,25)	9 (11,25)	
sim	3 (3,75)	4 (5,00)	-	
sintomas B**				0,6193
não	14 (17,50)	14 (17,50)	5 (6,25)	
sim	24 (30,00)	19 (23,75)	4 (5,00)	
Bulky**				0,755
não	14 (17,50)	13 (16,25)	2 (2,50)	
sim	24 (30,00)	20 (25,00)	7 (8,75)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

Tabela 11. Genótipo CYP3A5 e parâmetros clínicos de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo CYP3A5 A6986G			valor de <i>p</i>
	AA nº (%)	AG nº (%)	GG nº (%)	
sexo				0,0519
feminino	3 (3,66)	15 (18,29)	25 (30,49)	
masculino	-	8 (9,75)	31 (37,81)	
idade (anos)				1,00
< 60	2 (2,44)	15 (18,29)	35 (42,69)	
≥60	1 (1,22)	8 (9,75)	21 (25,61)	
tratamento*				0,5758
R-CHOP	2 (2,47)	13 (16,05)	37 (45,68)	
CHOP	-	6 (7,40)	12 (14,81)	
outros	1 (1,24)	4 (4,94)	6 (7,40)	
DHL (micromol/l)*				0,1493
≤480	-	6 (7,40)	25 (30,87)	
>480	3 (3,70)	17 (20,99)	30 (37,04)	
estadiamento*				0,6169
I	-	2 (2,47)	10 (12,35)	
II	2 (2,47)	10 (12,35)	15 (18,52)	
III	1 (1,24)	5 (6,17)	13 (16,05)	
IV	-	6 (7,40)	17 (20,98)	
ECOG*				0,4518
0	1 (1,24)	1 (1,24)	3 (3,70)	
1	1 (1,24)	13 (16,05)	36 (44,44)	
2	-	3 (3,70)	3 (3,70)	
3	1 (1,24)	6 (7,40)	11 (13,58)	
4	-	-	2 (2,47)	
nº sítios extranodal**				0,6804
0	1 (1,25)	13 (16,25)	26 (32,50)	
1	2 (2,50)	6 (7,50)	21 (26,25)	
mais que 1	-	4 (5,00)	7 (8,75)	
origem extranodal**				0,3614
não	2 (2,50)	16 (20,00)	32 (40,00)	
sim	1 (1,25)	7 (8,75)	22 (27,50)	
IPI score*				0,7742
1-2	1 (1,24)	13 (16,05)	31 (38,27)	
3-4	2 (2,47)	10 (12,35)	24 (29,62)	
comprometimento da medula óssea**				0,1714
não	3 (3,75)	23 (28,75)	47 (58,75)	
sim	-	-	7 (8,75)	
sintomas B**				0,4144
não	1 (1,25)	7 (8,75)	25 (31,25)	
sim	2 (2,50)	16 (20,00)	29 (36,25)	
Bulky**				0,3587
não	-	7 (8,75)	22 (27,50)	
sim	3 (3,75)	16 (20,00)	32 (40,00)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

Tabela 12. Genótipo MDR1 e parâmetros de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo MDR1 C3435T			valor de <i>p</i>
	CC n° (%)	CT n° (%)	TT n° (%)	
sexo				0,3549
feminino	16 (19,51)	19 (23,17)	8 (9,76)	
masculino	10 (12,19)	17 (20,73)	12 (14,63)	
idade (anos)				0,4525
< 60	14 (17,07)	25 (30,49)	13 (15,85)	
≥60	12 (14,63)	11 (13,41)	7 (8,53)	
tratamento*				0,4012
R-CHOP	18 (22,22)	22 (27,16)	12 (14,81)	
CHOP	4 (4,94)	7 (8,64)	7 (8,64)	
outros	3 (3,70)	7 (8,64)	1 (1,24)	
DHL (micromol/l)*				0,1617
≤480	7 (8,64)	18 (22,22)	6 (7,40)	
>480	18 (22,22)	18 (22,22)	14 (17,28)	
estadiamento*				0,2512
I	6 (7,40)	3 (3,70)	3 (3,70)	
II	6 (7,40)	17 (21,00)	4 (4,94)	
III	7 (8,64)	6 (7,40)	6 (7,40)	
IV	7 (8,64)	9 (11,11)	7 (8,64)	
ECOG*				0,9728
0	2 (2,47)	2 (2,47)	1 (1,24)	
1	14 (17,28)	21 (25,92)	15 (18,52)	
2	2 (2,47)	3 (3,70)	1 (1,24)	
3	7 (8,64)	8 (9,87)	3 (3,70)	
4	1 (1,24)	1 (1,24)	-	
n° sítios extranodal**				0,2186
0	12 (15,00)	15 (18,75)	13 (16,25)	
1	8 (10,00)	17 (21,25)	4 (5,00)	
mais que 1	5 (6,25)	3 (3,75)	3 (3,75)	
origem extranodal**				0,8349
não	17 (21,25)	21 (26,25)	12 (15,00)	
sim	8 (10,00)	14 (17,50)	8 (10,00)	
IPI score*				0,7791
1-2	14 (17,28)	21 (25,92)	10 (12,34)	
3-4	12 (14,81)	14 (17,28)	10 (12,34)	
comprometimento da medula óssea**				0,5288
não	23 (28,75)	33 (41,25)	17 (21,25)	
sim	2 (2,50)	2 (2,50)	3 (3,75)	
sintomas B**				0,9172
não	10 (12,50)	14 (17,50)	9 (11,25)	
sim	15 (18,75)	21 (26,25)	11 (13,75)	
Bulky**				0,4014
não	10 (12,50)	10 (12,50)	9 (11,25)	
sim	15 (18,75)	25 (31,25)	11 (13,75)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(2), **(1)

Tabela 13. Genótipo MDR1 e parâmetros de pacientes com LDGCB

variável	Genótipo MDR1 C1236T			valor de p
	CC n° (%)	CT n° (%)	TT n° (%)	
sexo				0,0316
feminino	22 (26,83)	17 (20,73)	4 (4,88)	
masculino	9 (10,98)	24 (29,27)	6 (7,31)	
idade (anos)				0,5295
< 60	19 (23,17)	28 (34,14)	5 (6,10)	
≥60	12 (14,63)	13 (15,86)	5 (6,10)	
tratamento*				0,8195
R-CHOP	20 (24,70)	25 (30,86)	7 (8,64)	
CHOP	6 (7,40)	11 (13,58)	1 (1,24)	
outros	4 (4,94)	5 (6,17)	2 (2,47)	
DHL (micromol/l) *		-		0,4534
≤480	9 (11,11)	17 (21,00)	5 (6,17)	
>480	21 (25,92)	24 (29,63)	5 (6,17)	
estadiamento*				0,9552
I	4 (4,94)	7 (8,64)	1 (1,24)	
II	12 (14,81)	13 (16,05)	2 (2,47)	
III	6 (7,40)	10 (12,35)	3 (3,70)	
IV	9 (11,11)	11 (13,58)	3 (3,70)	
ECOG*				0,1379
0	3 (3,70)	1 (1,24)	1 (1,24)	
1	19 (23,45)	24 (29,63)	7 (8,64)	
2	3 (3,70)	3 (3,70)	-	
3	5 (6,17)	13 (16,05)	-	
4	1 (1,24)	-	1 (1,24)	
n° sítios extranodal**				0,5027
0	17 (21,25)	19 (23,75)	4 (5,00)	
1	8 (10,00)	18 (22,50)	3 (3,75)	
mais que 1	5 (6,25)	4 (5,00)	2 (2,50)	
origem extranodal**				0,3614
não	21 (26,25)	25 (31,25)	4 (5,00)	
sim	9 (11,25)	16 (20,00)	5 (6,25)	
IPI score*				0,6584
1-2	18 (22,22)	21 (25,92)	6 (7,40)	
3-4	13 (16,05)	20 (24,69)	3 (3,70)	
comprometimento da medula óssea**				0,7458
não	27 (33,75)	38 (47,50)	8 (10,00)	
sim	3 (3,75)	3 (3,75)	1 (1,25)	
sintomas B**				0,2157
não	13 (16,25)	14 (17,50)	6 (7,50)	
sim	17 (21,25)	27 (33,75)	3 (3,75)	
Bulky**				0,4487
não	11 (13,75)	13 (16,25)	5 (6,25)	
sim	19 (23,75)	28 (35,00)	4 (5,00)	

Nota: Número de pacientes em parênteses cujos dados foram ignorados: *(1), **(2)

5.6 Sobrevida Global (SG)

A sobrevida global foi calculada como o intervalo de tempo entre a data do início do tratamento e o óbito ou perda de segmento (última avaliação do paciente).

Dos parâmetros clínicos avaliados neste estudo apenas tratamento, IPI, idade, estadiamento e ECOG apresentaram associação com significado estatístico em relação à SG.

5.6.1 Tratamento

Como demonstrado na Tabela 14, à maioria dos pacientes receberam tratamento com R-CHOP, tendo sido 64,19% dos pacientes tratados com R-CHOP, 22,23% tratados com CHOP e apenas 13,58% tratados com outros esquemas quimioterápicos.

Independentemente do tratamento recebido, foram observados 18 óbitos no total. Quanto ao tratamento com R-CHOP, a estimativa era de 11 óbitos, mas apenas 7 (13,46%) foram observados. Para o tratamento com CHOP e outros, o número de óbitos observados foi maior do que o esperado (3,8% e 2,2%, respectivamente) (Tabela 14).

Observamos associação com significado estatístico em relação ao tratamento e a SG dos pacientes ($p=0,0129$). Na figura 17 pode ser observado que o tempo de SG e o número de pacientes com sobrevida acima de 3 anos foi maior quando o tratamento foi realizado com R-CHOP.

Tabela 14. Relação entre tratamento, número de pacientes e óbitos

Variável	Tratamento			Total
	R-CHOP nº (%)	CHOP nº (%)	Outros nº (%)	
nº de pacientes	52 (64,19)	18 (22,23)	11 (13,58)	81
nº de óbitos	7 (13,46)	5 (27,77)	6 (54,54)	18

Figura 18. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao tratamento recebido

5.6.2 IPI

Na figura 18 pode-se observar que o tempo de SG e o número de pacientes com sobrevida acima de 3 anos foi maior em relação ao IPI1 do que ao IPI2 ($p=0,000342$).

Dos 45 pacientes com classificação de IPI1 apenas 3 (6,66%) foram a óbito e, dos 35 pacientes com classificação de IPI2, 14 (40%) foram a óbito. O tempo médio de vida dos pacientes com classificação de IPI1 foi de 2584 dias ($dp=103,8$) e dos pacientes com classificação de IPI2 foi de 841 dias ($dp=65,6$).

5.6.3 Idade

Na figura 19 é possível observar que o tempo de SG dos pacientes foi maior no grupo de pacientes com idade abaixo de 60 anos ($p=0,0155$).

Dos 52 pacientes com idade abaixo de 60 anos, 7 (13,46%) foram a óbito e dos 29 pacientes com idade acima de 60 anos, 11 (37,93%) foram a óbito. O tempo médio de vida dos pacientes com idade abaixo de 60 anos foi de 2400 dias ($dp=130,1$) e dos pacientes com idade acima de 60 anos foi de 856 dias ($dp=71,8$).

Figura 19. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao IPI dos pacientes, sendo IPI=1 para classificação 1 e 2 de IPI e IPI 1=2 para classificação 3 e 4 de IPI

Figura 20. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação à idade dos pacientes, sendo Idcod=1 pacientes com idade abaixo de 60 anos e Idcod=2 pacientes com idade acima de 60 anos

5.6.4 Estadiamento

Como demonstrado na tabela 15, dos 80 pacientes avaliados, 22 (27,50%) apresentavam estadiamento grau 4, assim como o maior número de pacientes que foram a óbito (45,45%).

Na figura 21 observa-se que quanto maior o grau de estadiamento do paciente menor sua SG, demonstrando associação entre o grau de estadiamento e SG ($p=0,00281$). O tempo médio de vida dos pacientes com estadiamento grau 1 foi de 2771 dias ($dp=0$), estadiamento grau 2 foi de 1021 dias ($dp=33,9$), estadiamento grau 3 foi de 849 dias ($dp=77,0$) e estadiamento grau 4 foi de 811 dias ($dp=82,8$).

5.6.5 ECOG

Como demonstrado na tabela 16, dos 80 pacientes avaliados, 5 (6,25%) apresentavam ECOG 0, 50 (62,50%) ECOG 1, 6 (7,50%) ECOG 2, 18 (22,50%) ECOG 3 e 1 (1,25%) ECOG 4, tendo sido os pacientes com ECOG 3 os que mais foram a óbito (44,44%).

Na figura 22 observa-se que quanto maior a classificação de ECOG, menor o tempo de SG dos pacientes, demonstrando então associação entre ECOG e SG ($p=0,00869$). O tempo médio de vida dos pacientes com ECOG 0 foi de 895 dias ($dp=86,6$), ECOG 1 foi de 2298 dias ($dp=152,1$), ECOG 2 foi de 1076 dias ($dp=0$), ECOG 3 foi de 676 dias ($dp=75,0$) e ECOG 4 foi de 710 dias ($dp=0$).

Tabela 15. Relação entre estadiamento, número de pacientes e óbitos

Variantes	Estadiamento				Total
	1 nº (%)	2 nº (%)	3 nº (%)	4 nº (%)	
nº de pacientes	12 (15,00)	27 (33,75)	19 (23,75)	22 (27,50)	80
nº de óbitos	0	2 (7,40)	5 (26,32)	10 (45,45)	17

Figura 21. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao estadiamento dos pacientes

Tabela 16. Relação entre ECOG, número de pacientes e óbitos

Variantes	ECOG					Total
	0 n° (%)	1 n° (%)	2 n° (%)	3 n° (%)	4 n° (%)	
n° de pacientes	5 (6,25)	50 (62,50)	6 (7,50)	18 (22,50)	1 (1,25)	80
n° de óbitos	1 (20,00)	8 (16,00)	0	8 (44,44)	0	17

Figura 22. Tempo de Sobrevida Global em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao ECOG

5.7 Sobrevida Livre de Doença (SLD)

A sobrevida livre de doença foi calculada com base no tempo decorrido entre o fim do tratamento e a recaída (data da última observação sem evidência de doença ou morte).

Dos parâmetros clínicos avaliados neste estudo apenas idade, estadiamento e ECOG apresentaram associação com significado estatístico em relação à SLD.

5.7.1 Idade

Nossos dados demonstraram diferenças significativas entre idade abaixo de 60 anos (Idcod 1) e o tempo de SLD. Na figura 23 é possível observar que o tempo de SLD dos pacientes Idcod 1 foi maior do que os pacientes Idcod 2.

Dos 52 pacientes com idade abaixo de 60 anos, 39 apresentaram SLD de 831 dias (dp=83,7) enquanto dos 29 pacientes com idade acima de 60 anos, 28 apresentaram SLD de 628 dias (dp=43,5).

5.7.2 Estadiamento

Houve diferenças significativas entre os estadiamentos e o tempo de SLD, sendo que os pacientes com estadiamento 1 apresentaram maior tempo de SLD ($p=0,0402$) quando comparado aos demais estadiamentos (Figura 25).

Dos 12 pacientes com estadiamento 1, 10 apresentaram SLD de 976 dias (dp=196,6), dos 27 pacientes com estadiamento 2, 19 apresentaram SLD de 763 dias (dp=44,6), dos 19 pacientes com estadiamento 3, 18 apresentaram SLD de 579 dias (dp=51,5) e dos 22 pacientes com estadiamento 4, 19 apresentaram SLD de 716 dias (dp=59,7).

5.7.3 ECOG

De acordo com os dados obtidos, foi possível observar diferenças significativas entre a classificação de ECOG e SLD. Os pacientes com ECOG 3 apresentaram menor tempo de SLD ($p=0,0142$) quando comparado as demais classificações (Figura 26).

Dos 5 pacientes com ECOG 0, 3 apresentaram SLD de 855 dias (dp=89,2), dos 50 pacientes com ECOG 1, 42 apresentaram SLD de 796 dias (dp=73,6), dos 6 pacientes com ECOG 2, 4 apresentaram SLD de 895 dias (dp=74,6), dos 18 pacientes com ECOG 3, 16 apresentaram SLD de 552 dias (dp=48,2) e o único pacientes com ECOG 4 apresentou 710 dias de SLD (dp=0).

Figura 23. Tempo de Sobrevida Livre de Doença em dias e a proporção de sobreviventes em relação à idade dos pacientes, sendo Icdod=1 pacientes com idade abaixo de 60 anos e Icdod=2 pacientes com idade acima de 60 anos

Figura 24. Tempo de Sobrevida Livre de Doença em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao estadiamento dos pacientes

Figura 25. Tempo de Sobrevida Livre de Doença em dias e a proporção de sobreviventes em relação ao ECOG dos pacientes

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, dentre todos os parâmetros clínicos avaliados em relação ao tratamento, apenas ECOG ($p=0,0193$) e número de sítios extranodais envolvidos ($p=0,0377$) apresentaram associação com significado estatístico. Os dados demonstraram que quanto menor a classificação ECOG e nenhum envolvimento de sítio extranodal, maior o número de pacientes que obtiveram RC ao tratamento.

Changhoon et al. (2010) demonstraram em seu estudo associação estatisticamente significativa ($p=0,04$) entre o envolvimento de mais de 3 sítios extranodais em pacientes tratados com R-CHOP como pior prognóstico à RC ao tratamento.

Outro estudo, GELA, avaliou o tratamento com CHOP e R-CHOP, oito ciclos, em pacientes com LDGCB no qual 80% dos pacientes apresentavam classificação ECOG de 0 a 1, 30% doença volumosa (*bulky*) e 75% a 80% menos de dois sítios de doença extranodal. A taxa de RC foi de 52% no grupo do rituximabe e 37% no grupo sem o anticorpo monoclonal (Coiffier et al., 2002) como observado em nosso estudo, no qual a RC ao tratamento com R-CHOP também demonstrou superioridade (51,25%) ao tratamento com CHOP (12,5%).

Em nosso estudo, mesmo o valor de p não tendo sido estatístico ($p=0,0669$), é uma importante observação e que deve ser mencionada pois indica a obtenção de um melhor resultado ao tratamento quando este se faz com R-CHOP já que o número de pacientes com RC foi superior aos pacientes com RP e refratária.

Coiffier et al. (1998) avaliaram, em estudo de Fase II, o uso de rituximabe em 54 pacientes com LNH agressivo, recidivado ou refratário à quimioterapia - pacientes com linfoma difuso de grandes células, linfoma da célula do manto ou outros linfomas de célula B de grau intermediário e agressivo. Dezesete pacientes responderam, sendo que 5 deles alcançaram RC e 12 RP. Na análise de intenção de tratamento (definida para identificar fatores associados com um prognóstico favorável) o percentual de resposta foi de 31%. Entre 12 pacientes com diagnóstico de linfoma da célula do manto, 4 (33%) apresentaram resposta. A conclusão do estudo foi que o rituximabe tem atividade significativa no linfoma difuso de grandes células e linfoma da célula do manto, devendo ser testado em combinação com quimioterapia em pacientes com estes diagnósticos.

Em relação aos linfomas agressivos, os estudos clínicos sugerem que o rituximabe pode ser útil no seu tratamento. Coiffier et al. (2002) realizaram um estudo de Fase III que incluiu 399 pacientes idosos (com mais de 60 anos de idade) com LDGCB e observaram que o rituximabe aumentou o percentual de RC e prolongou a SG e SLD, sem aumento significativo da toxicidade (Dobbin et al., 2002).

Dado o benefício demonstrado na literatura, a inclusão de rituximabe no tratamento de pacientes com LDGCB é recomendada, especialmente no tratamento de pacientes com mais de 18 anos, estágios II-IV ou estágio I com *bulky disease* e boa *performance status* (ECOG 0-3).

Em relação ao polimorfismo de presença ou ausência do gene GSTM1, houve associação com significado estatístico entre idade e resposta

ao tratamento. Os achados deste estudo demonstraram que dos 30 pacientes com idade acima de 60 anos, 21 (25,61%) apresentaram genótipo positivo e apenas 9 (10,98%) genótipo negativo ($p=0,0416$). Também, neste trabalho, foi demonstrada maior eficiência em relação ao tratamento com R-CHOP se comparado ao tratamento com CHOP ($p=0,0372$).

Nossos resultados demonstraram ausência de associação com significado estatístico no estudo de GSTT1, mas na literatura há trabalhos que relatam dados significativos quanto aos genótipos nulos de GSTT1 e GSTM1, porém são dados que se referem a estudos realizados em outros tipos de neoplasias.

Segundo Cho et al. (2010), polimorfismos em GST não apresentam relação quanto a resposta ao tratamento com R-CHOP de pacientes coreanos com LDGCB, mas neste mesmo trabalho, os autores demonstraram associação do genótipo GSTT1 nulo em pacientes com LDGCB em relação a toxicidade ao tratamento com quimioterapia R-CHOP.

Pacientes com LDGCB, após quimioterapia com R-CHOP, apresentaram forte associação em relação ao genótipo GSTT1 nulo quanto às reações de toxicidade como leucopenia, febre e mucosite. Já quando há deleção de ambos os genes (GSTT1 e GSTM1), os pacientes desenvolveram severa trombocitopenia (Cho et al., 2010). O genótipo GSTT1 nulo também foi associado ao risco aumentado de LDGCB (OR=11.948) (Al-Dayel et al., 2008).

Voso et al. (2002) demonstraram que pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e genótipos nulos de GSTT1 e GSTM1 apresentam

baixa taxa de resposta a quimioterapia e baixa sobrevida. Outros grupos de pesquisadores (Hohaus et al., 2007) demonstraram que pacientes com linfoma folicular (LF) e genótipos nulos de GSTT1 e GSTM1 apresentam pior SLD e Dieckvoss et al., (2002) demonstraram que crianças com LNH e genótipo nulo de GSTM1 apresentam mais chances de falha no tratamento quimioterápico.

Para GSTP1, polimorfismo A1578G (éxon 5), foi observado associação com significado estatístico entre o número de sítios extranodais envolvidos e o genótipo homozigoto do alelo G, no qual o número de homozigotos do alelo G (6,25%) que apresentaram envolvimento de mais de um sítio extranodal foi superior ao observado nos demais genótipos (3,75%) ($p=0,0307$).

Trabalhos na literatura relatam que o alelo GSTP1*105Val (alelo G) é um fator prognóstico favorável em pacientes com LMA tratados de acordo com protocolos padrões para o tratamento da doença (Voso et al., 2008). Esse mesmo alelo também foi associado como fator prognóstico favorável em outras malignidades como câncer de mama, câncer de cólon e linfoma Hodgkin (Sweeney et al., 2000; Stoehlmacher et al., 2002; Hohaus et al., 2005).

Diferentemente do resultado encontrado neste estudo, há trabalhos que relatam a associação do genótipo homozigoto do alelo GSTP1*105Val (alelo G) e o sexo. Segundo Yang et al. (2005), o sexo feminino apresenta 60% na redução do risco de mortalidade no câncer de mama invasivo e que

esta redução está associado ao genótipo homozigoto do alelo G se comparado ao homozigoto do alelo GSTP1*105Ile (alelo A).

Para o alelo GSTP1*105Val, estudos também observaram SLD de 5 anos nos pacientes com LH em comparação aos pacientes heterozigotos e homozigotos para o alelo GSTP1*105Ile (Hohaus et al., 2005). Dasgupta et al., (2003) observaram melhor sobrevida em pacientes com mieloma múltiplo e o alelo GSTP1*105Val tratados com quimioterapia convencional, enquanto nenhuma diferença foi observada no resultado desses tratamentos com terapia de alta-dose. Em nosso estudo, não observamos nenhuma diferença tanto na SG como na SLD.

Nossos resultados demonstraram ausência de associação com significado estatístico no estudo do polimorfismo C2293T (éxon6) do GSTP1, mas segundo Al-Dayel et al. (2008), o genótipo homozigoto Val/Val (TT) demonstrou associação significativa no risco de LDGCB em indivíduos da Arábia Saudita (OR=3.422).

Para o estudo de PON1, polimorfismo Q192R (Gln192Arg), foi observada associação com significado estatístico entre o genótipo, sintomas B e *bulky*. Os dados demonstraram que o número de pacientes (25%) que apresentaram sintomas B foi maior em relação ao genótipo homozigoto do alelo Q ($p=0,0201$). Para os pacientes que apresentaram *bulky*, o número foi maior (38,75%) em relação ao genótipo heterozigoto ($p=0,0148$).

Uyar et al. (2011), em estudo de pacientes com carcinoma renal, demonstraram que esse mesmo polimorfismo apresenta diferença significativa entre pacientes e grupo controle. O alelo Q foi mais freqüente

nos pacientes do que no grupo controle. Segundo os autores, com este estudo, foi possível concluir que o alelo R poderia atribuir efeito protetor nas células de carcinoma renal.

Em consideração ao linfoma, na literatura há trabalhos controversos que relatam associação desse mesmo polimorfismo e o risco aumentado (2.5 vezes) para o LNH (Kerridge et al., 2002; Costa et al., 2003) como, também, a sua não associação (De Roos et al., 2006). Pouco ainda se sabe sobre a interação desse polimorfismo e o LNH. Mais estudos precisam ser realizados para caracterizar o real papel da PON nos LNH.

Embora nossos dados tenham demonstrado ausência de associação com significado estatístico entre o estudo de NQO1 (C609T) e os parâmetros clínicos avaliados, na literatura, pacientes com genótipo homozigoto do alelo T (Ser) apresentam SLD significativamente baixa quando comparado aos pacientes com genótipo heterozigoto e homozigoto do alelo C (Pro) ($p=0,05$) (Silveira et al., 2009).

Há trabalhos que relatam significante associação entre o alelo polimórfico T e resposta lenta a terapia como crianças com genótipo homozigoto do alelo T e significante baixa na SLD. A associação do alelo variante T (Ser) tem sido relacionado a um pior prognóstico nas leucemias linfoblástica aguda (LLA) (Krajinovic et al., 2002; Bolufer et al., 2006) e nas LMA (Barragan et al., 2007).

O polimorfismo C609T resulta na substituição do aminoácido prolina pela serina o que promove uma ubiquitinação com rápida degradação da proteína variante, fator que explica a resposta lenta a terapia.

Ainda há trabalhos controversos quanto à atividade e fenótipo-genótipo de NQO1. Gan et al. (2001) demonstraram em seu estudo associação da citotoxicidade da mitomicina C (MMC), medicamento utilizado no tratamento de pacientes com câncer de bexiga superficial, e a atividade de NQO1. Entretanto, a eficácia da MMC não foi correlacionada com a expressão de NQO1 no estudo retrospectivo de pacientes com câncer de bexiga superficial (Basu et al., 2004). Esses dados se contradizem ao estudo de Fleming et al. (2002) no qual identificaram aumento da eficácia de MMC associado ao alelo C quando comparado ao alelo T. Mais estudos ainda precisam ser realizados para elucidar com clareza essas controversas.

Neste estudo foi observada ausência de associação com significado estatístico entre os polimorfismos G516T (Gln172His; éxon 4) e A785G (Lys262Arg; éxon 5) do CYP2B6 em relação aos parâmetros clínicos avaliados.

O CYP2B6 tem sido reportado na literatura como a principal enzima envolvida na ativação da ciclofosfamida (Chang et al., 1993) e, alguns de seus polimorfismos, como o G516T (*9) e A785G (*4), têm sido associados a um pobre prognóstico (Bray et al., 2010).

As variantes do CYP2B6 têm sido associadas à diminuição (Lang et al., 2001; Jinno et al., 2003) e modificação (Xie et al., 2003) na expressão da proteína quando comparado ao gene *wild-type*. O aumento da atividade específica associada com as variantes também tem sido observado (Lang et al., 2001; Jinno et al., 2003).

Trabalhos relatam que as variantes do CYP2B6 conferem diferença na farmacocinética da ciclofosfamida (Xie et al., 2006) como existe, também, estudos que falharam na tentativa de mostrar algum impacto estatisticamente significativo (Timm et al., 2005; Nakajima et al., 2007; Ekhardt et al., 2008).

Investigações quanto ao impacto dos SNPs do CYP2B6 na farmacocinética dos fármacos, tem demonstrado a existência dos genótipos metabolizadores lentos e rápidos como, por exemplo, a variante CYP2B6*9 (G516T) que tem sido associada com a diminuição do *clearance* do anti-retroviral inibidor de transcriptase reversa efavirez (Haas et al., 2004; Ramachandran et al., 2009).

Nossos dados, referente ao polimorfismo A6986G do CYP3A5, demonstraram associação com significado estatístico em relação à variável sexo, associação ainda não foi observada em outros estudos. O número de pacientes homozigotos do alelo G foi maior (68,3%) do que nos demais genótipos, sendo esta maioria do sexo masculino (37,81%), superando o sexo feminino em 30,49% ($p=0,0519$).

De acordo com Kuehl et al. (2001), o polimorfismo CYP3A5*3 (A6986G) promove um *splice* alternativo resultando na terminação prematura do mRNA e, desta forma, não seria surpreendente que indivíduos com essa variante possam apresentar expressão diminuída da enzima e aumento no risco de toxicidade por fármacos (Pakakasama et al., 2005).

Há relatos que também sugerem um possível efeito protetor a esta mesma variante. Segundo Pakakasama et al (2005), o alelo G demonstrou

uma tendência de efeito protetor na LLA de infância. Possivelmente indivíduos com o alelo G estariam menos expostos a toxicidade dos metabólitos intermediários por causa da baixa expressão enzimática em decorrência da presença deste alelo.

Quanto à análise de MDR1, polimorfismo C3435T, foi observado ausência de associação com significado estatístico entre os parâmetros clínicos avaliados. Para o polimorfismo C1236T, foi observada associação com significado estatístico entre os heterozigotos e a variável sexo, no qual 50% dos pacientes apresentaram genótipo CT, sendo 29,27% desses pacientes do sexo masculino ($p=0,0316$). Essa associação entre o genótipo e sexo não foi observada em outros estudos.

Segundo alguns estudos, o polimorfismo C1236T apresentou correlação positiva quanto a SG de pacientes com outras malignidades. Schaich et al. (2009), em seu estudo de pacientes com glioblastoma tratados com temozolomide, demonstraram que pacientes com genótipo homozigoto do alelo C obtiveram SG de 2 anos (37%) quando comparado aos heterozigotos e homozigotos do alelo T (8% e 10% respectivamente) ($p=0,02$).

Quanto ao tratamento, Illmer et al. (2009) demonstraram em seu estudo que o genótipo CC, para ambos os polimorfismos (C3435T e C1236T), apresenta melhor resultado em relação a quimioterapia com R-CHOP se comparado aos genótipos heterozigoto e homozigoto do alelo T.

É possível que esses polimorfismos influenciem na expressão e função das proteínas do gene MDR1, mas ainda não sabemos se este é o

caminho correto para uma explicação. Possivelmente, o desequilíbrio de ligação, já encontrado nos SNPs dos éxons 12, 21 e 26, possa estar relacionado à ligação dos polimorfismos no gene MDR1 e os fenômenos observados (Illmer et al., 1999).

Vários estudos tratam a associação dos genótipos ABCB1 com disposição dos substratos da P-gp em humanos. Estas investigações são baseadas na observação inicial que o genótipo ABCB1 T3435T está associado com baixa expressão da P-gp intestinal em humanos em comparação com indivíduos de genótipo C3435T ou CC (Hoffmeyer et al., 2000).

O conhecimento do haplótipo do gene ABCB1 em diferentes populações é importante para elucidar os mecanismos de identificação das associações entre polimorfismos representados por cada haplótipo, expressão e função da P-gp (Schwab et al., 2003). Diferenças individuais no controle transcricional do gene humano ABCB1, incluindo variantes gênicas dos fatores de transcrição (Zhang et al., 2001), podem contribuir para a variabilidade na expressão da P-gp.

Dentre todos os parâmetros clínicos avaliados quanto a SG, apenas tratamento, IPI, idade, estadiamento e ECOG apresentaram associação com significado estatístico. Para SLD, os parâmetros com associação estatística foram idade, estadiamento e ECOG.

Nossos dados demonstraram que pacientes com idade acima de 60 anos apresentaram maior tempo de SG e SLD do que os pacientes com idade abaixo de 60 anos. A SG e SLD dos pacientes com idade acima de 60

anos foi de 856 dias ($p=0,0155$) e 628 dias ($p=0,0292$), respectivamente, enquanto que os pacientes com idade abaixo de 60 anos apresentaram SG e SLD de 2400 dias e 831 dias, respectivamente.

Outros estudos também demonstraram que o parâmetro idade é um importante fator ao prognóstico tendo sido, idade acima de 60 anos, associado ao pior prognóstico. Mesmo em outras classificações de linfoma, como o linfoma primário do SNC, este mesmo dado foi observado. O grupo de Estudo Internacional de Linfoma Extranodal demonstrou associação de pior prognóstico em relação aos pacientes com idade acima de 60 anos (Ferrerri et al., 2003) e, desta forma, influenciando nas taxas de SG e SLD.

Dados em relação à idade e ECOG também foram evidenciados como principais variáveis de prognóstico em outros trabalhos com protocolo padronizado (Corry et al., 1998; Abrey et al., 2000). *Performance Status* (ECOG) acima de 1 também é considerado como um fator de mau prognóstico.

Neste estudo, em referência ao ECOG, quanto maior a classificação, menor o tempo de SG e SLD. Pacientes com classificação ECOG 3 apresentaram tempo de SG de 676 dias ($p=0,00869$) e SLD de 552 dias ($p=0,0142$).

O estadiamento ou definição da extensão do linfoma, outro importante fator prognóstico, é determinado pelos critérios da Ann Arbor (Hallack Neto et al., 2006). Os pacientes são divididos em quatro estadios clínicos (ECs) e esta classificação demonstrou em alguns estudos associação em relação à SG e SLD dos pacientes com LDGCB.

Em nosso estudo foi observado que com aumento do grau do estadiamento, menor a SG dos pacientes. Em nossa casuística, pacientes com estadiamento quatro apresentaram SG de 811 dias ($p=0,00281$), tempo de sobrevida menor quando comparado aos pacientes com estadiamento abaixo de quatro. Quanto a SLD, foi observado maior tempo, 976 dias ($p=0,0402$), em relação aos pacientes com estadiamento um.

Estudo conduzido pelo grupo Southwest Oncology demonstrou que pacientes com EC II avaliados por 30 anos apresentaram SG em 5 anos de 49% e de 46% para pacientes com EC III e IV. Outro estudo demonstrou SG de 82% para pacientes com EC II tratados agressivamente e de 50% para os tratados com três CHOP e radioterapia (Miller, 2004).

Originalmente proposto em 1993, o Índice Internacional de Prognóstico (IPI) foi a primeira ferramenta clínica utilizada na predição de resultados para pacientes com LDGCB e, desde então, o tratamento deste linfoma passou a ser direcionado pelo IPI validado em vários estudos. Entretanto, diante as diferentes respostas à mesma terapêutica para pacientes do mesmo IPI, houve necessidade de se instituírem novos marcadores de prognóstico para pacientes com LDGCB (Hallack Neto et al., 2006).

De acordo com a classificação de IPI, nossos resultados demonstraram que o número de pacientes sobreviventes ao tratamento foi consideravelmente maior no grupo de pacientes com classificação de IPI1, no qual apenas 6,66% dos pacientes foram a óbito e, no grupo de pacientes com classificação de IPI2, 40% foram a óbito. O tempo de SG também foi

maior para os pacientes com classificação de IPI1 (2584 dias) quando comparado aos de IPI2 (841 dias) ($p=0,000342$).

Segundo o trabalho de Gonçalves EMF (1999), pacientes com LDGCB tratados com antraciclina em primeira linha apresentaram influência de forma significativa e independente na SG em relação ao IPI. De acordo com esse estudo, o IPI permitiu identificar 3 grupos de pacientes em relação à resposta, SG e SLD: 1- pacientes com elevada taxas de remissão completa, SG e SLD (IPI de baixo risco); 2- pacientes de risco intermediário (IPI de baixo risco/risco intermediário); 3- pacientes com baixa probabilidade de responder ao tratamento convencional e de sobrevida de 5 anos (IPI de risco intermediário alto / alto). O tempo de SG e SLD de 5 anos para os pacientes classificados como de risco baixo, intermediário baixo e intermediário alto foi de 73% e 63%, respectivamente. Para os pacientes classificados como de risco alto, 22% e 19% apresentaram SG e SLD de 5 anos, respectivamente.

Hallack Neto et. al. (2005) demonstraram em seu trabalho com pacientes com LDGCB, tratados com esquemas contendo antraciclina, que no grupo baixo risco adaptado (pacientes com IPI de risco baixo e intermediário) a RC foi de 78,3%, SG de 84,3% (IC (95%) = 91,7; 112,1) e SLD de 68,12% em sessenta meses (IC (95%) = 56,7; 82,5). No grupo alto risco adaptado (pacientes com IPI de risco intermediário e intermediário alto), a RC foi de 66,7%, SG de 54,8% (IC (95%) = 53,1; 82,5) e SLD de 46,6% em sessenta meses (IC (95%) = 53,5; 105,7), com significância estatística para a SG e SLD ($p=0,002$ e $0,02$ respectivamente).

Estudos clínicos têm avaliado a resposta ao tratamento com rituximabe, tanto nos casos de LNH indolentes como nos casos de LNH mais agressivos. Os estudos clínicos iniciais que levaram à aprovação deste medicamento pelo FDA incluíram pacientes com recaída de LNH de baixo grau e foliculares, utilizando este medicamento de forma isolada. Posteriormente, o rituximabe foi avaliado como tratamento inicial nos LNH indolentes. (Dobbin et al., 2002).

Esquemas quimioterápicos combinados com rituximabe, para linfoma de baixo grau, foram posteriormente testados e avaliados. Czuczman et al. (1999) publicaram o primeiro estudo com rituximabe combinado com CHOP, que incluiu 38 pacientes com LNH de baixo grau, cuja maioria não havia sido anteriormente tratada. Obteve-se 100% de resposta, sendo completa em 55% dos casos.

Howard et al. (2002) avaliaram a eficácia do rituximabe associado ao CHOP em 40 pacientes com linfoma de células de manto em estadio II a IV e não previamente tratados. Foi observada RC (sem confirmação molecular) em 48%, assim como 48% de RP. A SLD observada foi de 16,6 meses, entretanto, 28 de 40 pacientes apresentaram recaída ou progressão do linfoma.

Em relação aos linfomas agressivos, os estudos clínicos sugerem que o rituximabe pode ser útil no seu tratamento. Coiffer et al. (2002) realizaram estudo de fase III, que incluiu 399 pacientes idosos (acima de 60 anos de idade) com LDGCB, e observaram que a utilização do rituximabe aumentou

o percentual de RC como, também, prolongou a SG e SLD sem aumento significativo da toxicidade.

Em nosso estudo, a SG também apresentou aumento em relação ao tratamento com R-CHOP ($p=0,0129$), como também o aumento no número de sobreviventes ao tratamento.

Segundo o estudo GELA que avaliou o tratamento de oito ciclos com CHOP e R-CHOP em pacientes com LDGCB, a SG em 2 anos também foi superior no grupo do rituximabe em relação ao grupo com CHOP isolado (70% versus 57%; HR 0,64; 65% IC, 0,45-0,89; $p=0,0007$). A taxa de RC foi de 52% no grupo do rituximabe e 37% no grupo sem o anticorpo monoclonal (Coiffier et al., 2002).

Analisando o estudo de Coiffier et al. (2002) os autores alertam que, apesar deste estudo ter demonstrado percentual de sobrevida superior com a associação de CHOP e rituximabe (70%) comparando-se com CHOP isolado (57%), para um seguimento mediano de 2 anos, as diferenças na curva de sobrevida começam a diminuir aos 2,5 anos de seguimento e continuarão a diminuir com morte dos pacientes devido a idade, complicações do tratamento e complicações relacionadas à idade. Seguidos de maior tempo são necessários para confirmar se esta vantagem do esquema CHOP e rituximabe irá se manter. Os autores ainda enfatizam que a eficácia do tratamento para um tipo de linfoma não é, necessariamente, benéfico para outros tipos de linfoma voltando a enfatizar que o esquema CHOP é o tratamento padrão para o linfoma difuso de grandes células, mas não para o linfoma folicular e outros LNH de baixo

grau. Outras combinações com rituximabe têm demonstrado resultados promissores, porém estudos clínicos randomizados são necessários para definir o melhor esquema de tratamento (Dobbin et al., 2002).

7. CONCLUSÕES

- Maior eficiência da quimioterapia com R-CHOP independentemente do genótipo GSTM1.
- Associação entre a maior frequência do genótipo GSTM1 em relação ao genótipo nulo em pacientes com idade acima de 60 anos.
- Ausência de associação entre o polimorfismo do gene GSTT1 e os parâmetros clínicos avaliados.
- Associação entre o genótipo homozigoto para o alelo G do polimorfismo A1578G do GSTP1 e o número de sítios extranodais.
- Ausência de associação entre o polimorfismo C2293T do GSTP1 e os parâmetros clínicos avaliados.
- Associação entre o polimorfismo do PON1 e os parâmetros clínicos sintomas B e bulky.
- Ausência de associação entre o polimorfismo do NQO1 e os parâmetros clínicos avaliados.
- Ausência de associação entre os dois polimorfismos do CYP2B6 e os parâmetros clínicos avaliados.
- Para o polimorfismo do CYP3A5, houve associação apenas em relação ao sexo.
- Ausência de associação entre o polimorfismo C3435T do MDR1 e os parâmetros clínicos avaliados.

- Para o polimorfismo C1236T do MDR1, houve associação apenas em relação ao sexo.
- Os parâmetros clínicos de impacto em relação ao tratamento foram ECOG e número de sítios extranodais.
- Maior tempo de SG, acima de 3 anos, em relação ao pacientes com classificação IPI1.
- Relação de associação entre maior tempo de SG e pacientes com idade abaixo de 60 anos.
- Quanto maior o grau de estadiamento do paciente, menor o tempo de SG.
- Quanto maior a classificação de ECOG, menor o tempo de SG dos pacientes.
- Maior tempo de SLD em pacientes com idade abaixo de 60 anos.
- Maior tempo de SLD em relação aos pacientes com estadiamento 1.
- Menor tempo de SLD em pacientes com classificação de ECOG 3.
- Aumento do tempo de SG, acima de 3 anos, em pacientes tratados com R-CHOP.

8. REFERÊNCIAS

Abraham J, Earl HM, Pharoah PD, Caldas C. Pharmacogenetics of cancer chemotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1766:168-183.

Abramson J, Shipp M. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma- moving towards a molecularly targeted approach. *Blood*. 2005; 106:1164-1174.

Abrey LE, Yahalom J, DeAngelis LM. Treatment for primary CNS lymphoma: The next step. *J Clin Oncology*. 2000;18:3144-50.

Al-Dayel,F, Al-Rasheed M, Ibrahim M, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing CYP1A1, GSTT and GSTP contribute to the development of diffuse large B-cell lymphoma risk in the Saudi Arabian population. *Leukemia & Lymphoma*. 2008; 49(1):122-129.

Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular e específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim Nova*. 2005; 28(1):118-129.

Anderle P, Huang Y, Sadee W. Intestinal membrane transport of drugs and nutrients: Genomics of membrane transporters using expression microarrays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004; 21:17-24.

Anon. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The non-Hodgkn's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997; 89: 3909-3918.

Ariyoshi N, Miyazak M, Toide K, et al. A single nucleotide polymorphism of CYP2B6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 281:1256-1260.

Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2780-2795.

Atkinson DE, Greenwood SL, Sibley CP, et al. Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003; 285:C584-C591.

Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonase 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37:1304-1316.

Barragan E, Collado M, Cervera J, et al. The GST deletions and NQO1*2 polymorphisms confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Res*. 2007; 31: 947-953.

Basu S, Brown JE, Flannigan GM, et al. Immunohistochemical analysis of NAD(P)H: quinone oxidoreductase and NADPH cytochrome P450 reductase in human superficial bladder tumours: relationship between tumour enzymology and clinical outcome following intravesical mitomycin C therapy. *Int J Cancer*. 2004;109:703 -709.

Billecke S, Draganov D, Counsell R, et al. Human serum paraoxonase (PON1) isoenzymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metabolism and Disposition*. 2000; 28: 1335-1342.

Board PG. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione-S-transferase 3 genes to chromosome band 11q13 and 12q13-14. *Ann Hum Genet*. 1989; 53:205-213.

Bolufer P, Barragan E, Collado M, et al. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. *Leukemia Res*: 2006; 30: 1471-1497.

Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Cole et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *British Journal of Cancer*. 2010; 102:1003-1009.

Carbone PP, Kaplan HS, Musshof K, et al. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1971; 31:1860-1861.

Cascorbi I, Gerlogg T, John A, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 69:169-174.

Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther*. 2006; 112 (2):457-473.

Chang TKH, Weber GF, Crespi CI, Waxman DJ. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res*;1993, 53: 5629-5637.

Changhoon Y, Shin Kim, Byeong SS, Jeong-Eun K, Dok HY, Jooryung H, Dae Ho L, Sang-We K, Jung-Shin L, Cheolwon S. Modified Number of Extranodal Involved Sites as a Prognosticator in R-CHOP Treated Patients with Disseminated Diffuse Large B Cell Lymphoma. *The Korean Journal of Internal Medicine* 2010, 25 (3): 301-308.

Cho HJ, Eom HS, Kim HJ, et al. Glutathione S-transferase genotypes influence the risk of chemotherapy-related toxicities and prognosis in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2010, 198: 40-46.

Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, Engert A, Tilly H, Johnson P, et al. Rituximab (anti- CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with

relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood* 1998;92(6):1927-32.

Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP Chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 235-242.

Corry J, Smith JG, Wirth A, Quong G, Liew KH. Primary CNS lymphoma: age and performance status are more important than treatment modality. *Int J Radiol Oncol Biol Phys.* 1998; 41:615-20.

Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol.* 2005; 15: 69(4): 541-550.

Costantini AS, Miligi L, Kriebel D, et al. A multicenter case-control study in Italy on hematolymphopoietic neoplasms and occupation. *Epidemiology.* 2001; 12:78–87.

Cotton SC, Sharp LJ. Brockton, N. Glutathione-S-transferase polymorphisms and colorectal cancer. *Am J Epidemiol.* 2000; 151(1):7-32.

Czuczman MS, Grillo-López AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, Lo Buglio AF, et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti- CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999;17(1):268-76

Dasgupta RK, Adamson PJ, Davies FE, et al. Polymorphic variation in GSTP1 modulates outcomes following therapy for multiple myeloma. *Blood:* 2003; 102: 2345-2350.

Danzuckerman RS, Hochberg E. Intravascular lymphoma: The oncologist's "great imitator". *Oncologist.* 2006: 681-685.

Deakin M, Elder J, Hendrickse C, et al. Glutathione-S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis.* 1996; 17:881-884.

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research.* 2001a; 11:1156-1166.

Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Rev.* 2001b; 42:1007-1017.

Deeken JF, Figg WD, Bates SE, Sparreboom A. Toward individualized treatment: prediction of anticancer drug disposition and toxicity with pharmacogenetics. *Anti-Cancer Drugs.* 2007; 18:111-126.

De Jong JL, Mohandas T, Tu CD. The human H (MU) class glutathione -S-transferase are encoded by a dispersed gene family. *Biochem and Biophys Res Commun.* 1991; 180:15-22.

De Roos AJ, Gold LS, Wang S, et al. Metabolic genes variants and risk of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15 (9): 1647-1653.

DeVita VT, Canellos GP, Chabner B, et al. Advanced diffuse histiocytic lymphoma, a potentially curable disease. *Lancet* 1975; 248-250.

Dey S. Single nucleotide polymorphisms in human P-glycoprotein: its impact on drug delivery and disposition. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006; 3:23-35.

Dieckvoss BO, Stanulla M, Schrappe M, et al. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes in pediatric non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2002; 87: 709-713.

Dobbin JA, Henry Luiz Najman HL, Gadelha MIP. Treatment of mantle-cell lymphoma with Rituximab. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2002, 48(2): 257-262.

Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood.* 1997; 89: 2291-2297.

Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science.* 1999; 286:487-491.

Ekhart C, Doodeman VD, Rodenhuis S, et al. Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. *Pharmacogenet Genomics.* 2008; 18: 515-523.

Ekins S, Vandenbranden M, Ring BJ, et al. Further characterization of the expression in liver and catalytic activity of CYP2B6. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 286:1253-1259.

Ferreri AJM, Blay JY, Reni M, Pasini F, Spina M, Ambrosetti A et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: The International Extranodal Lymphoma Study Group Experience. *J Clin Oncol.* 2003;21:266-72.

Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 2005; 23:4117-4126.

Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 328:1002-1006.

Fleming RA, Drees J, Loggie BW, et al. Clinical significance of a NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 polymorphism in patients with disseminated peritoneal cancer receiving intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C. *Pharmacogenetics*. 2002;12:31-37.

Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; 54:1295-1310.

Franceschi S, Serraino D, La Vecchia C, et al. Occupation and risk of Hodgkin's disease in north-east Italy. *Int. J. Cancer*. 1991; 48:831-835.

Fryer AA, Zhao L, Aldersea J, et al. Use of site-directed mutagenesis of allele-specific PCR primers to identify the GSTM1A, GSTM1B, GSTM1A,B and GSTM1 null polymorphisms at the glutathione-S-transferase, GSTM1 locus. *Biochemical Journal*. 1993; 295:313-315.

Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M. Iron induces lipid peroxidation in cultured macrophages, increases their ability to oxidatively modify LDL, and affects their secretory properties. *Atherosclerosis*. 1994; 111:65-78.

Gan YB, Mo YQ, Kalns JE, et al. Expression of DT-diaphorase and cytochrome P450 reductase correlates with mitomycin c activity in human bladder tumors. *Clin Cancer Res* 2001;7:1313 - 1319.

Gonçalves, EMF. Linfoma Difuso de Grandes Células B. Fatores de Prognóstico Clínico [Dissertação]. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto, Instituto Português de Oncologia do Porto, Jefferson Medical College; 1999.

Gonzalez TP, Schiengold M, Chies JAB. Implicações clínicas dos polimorfismos do gene de resistência a múltiplas drogas MDR1 (ABCB1). *Revista Brasileira de Biociências*. 2006; 4(¾):27-38.

Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by multidrug transporter. *Ann Rev Biochem*. 1993; 62:386-427.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2:48-58.

Grogan TM, Miller TP, Fisher RL. A Southwest Oncology Group Perspective on the Revised European – American Lymphoma Classification. *Hematology/Oncology Clins of N América*. 1997; 11: 819-46.

Guan S, Huang M, Li X, et al. Intra- and inter-ethnic differences in the allele frequencies of cytochrome P450 2B6 gene in Chinese. *Pharmaceutical Research*. 2006; 23(9):1983-1990.

Guimarães JRQ. *Manual de Oncologia*, 1 ed. São Paulo: BBS, 2004; p. 147-178.

Haas DW, Ribaud HJ, Kim RB, et al. Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group of study. *AIDS*. 2004; 18: 2391-2400.

Hallack Neto, AE. Tratamento do linfoma difuso de grandes células B: experiência do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Hallack Neto AE, Pereira J, Dorlhiac-Llacer P, Beitler B e Chamone DAF. Aplicação e índice prognóstico internacional em pacientes com linfoma difuso de grande células B em uma instituição brasileira. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2005;27(1):27-30.

Hallack Neto AE, Pereira J, Saboya R, et al. Estratificação de risco em linfoma difuso de grandes células B. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006; 28(4):296-300.

Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2000; 109: 584-591.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994; 84: 1361-1392.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. Lymphoma classification - from controversy to consensus: The REAL and WHO classifications of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol.* 2000; 11(suppl1): 3-10.

Hayes JD, Pulford DL. The glutathione-S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30:445-600.

Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoprotein in a genetic isolate. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15:89-95.

Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vainio H. The GSTM1 null genotype as a risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis.* 1993; 14:1479-1482.

Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 2000; 97:3473-3478.

Hohaus S, Massini G, D'alo F, et al. Association between glutathione-S-transferase genotypes and Hodgkin's lymphoma risk and prognosis. *Clinical Cancer Research*. 2003; 9:3435-3440.

Hohaus S, Di Ruscio A, Di Febo A, et al. Glutathione S-transferase P1 genotype and prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*: 2005; 11: 2175-2179.

Hohaus S, Mansueto G, D'Alo F, et al. Glutathione S-transferase genotypes influence prognosis in follicular non-Hodgkin's Lymphoma. *Leukemia Lymph*. 2007; 48: 564-569.

Howard OM, Gribben JG, Neuberg DS, Grossbard M, Poor C, Janicek MJ, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol* 2002;20(5):1288-94.

Illmer T, Schaich M, Oelschlagel U, et al. A new PCR MIMIC strategy to quantify low *mdr1* mRNA levels in drug resistant cell lines and AML blast samples. *Leuk Res* 1999; 23: 653-663.

<http://www.inca.org.br/cancer>, acessada em junho 2003.

<http://www.inca.org.br>, acessado em Março 2010.

Huang Y, Sadee W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and sensitivity of tumor cells. *Cancer Letter*. 2006; 239: 168-182.

Huang Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26:183-201.

Hunt KE, Reichard KK. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008; 132(1):118-124.

Hustert E, Haberl M, Burk O, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2001; 11: 773-779.

Hutchinson E. Working towards tailored therapy for cancer. *Lancet*. 2001; 357(9267):1508.

James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion stability. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37:1986-1994.

Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ohno A, et al. Functional characterization of cytochrome P4502B6 allelic variants. *Drug Metab Dispos*: 2003; 31: 398-403.

Johns LE, Houlston RS. Glutathione-S-transferase $\mu 1$ (GSTM1) status and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Mutagenesis*. 2000; 15:399-404.

Kalow W, Tang BK, Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter-and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics*. 1998; 8(4):283-289.

Kelada SN, Eaton DL, Wang SS, et al. The role of genetic polymorphisms in environmental health. *Environmental Health Perspectives*. 2003; 111:1055-1064.

Kerridge I, Lincz L, Scorgie F, et al. Association between xenobiotic gene polymorphisms and non-Hodgkin's lymphoma risk. *British Journal of Haematology*. 2002; 118:477-481.

Kessel D, Hall TC, Roberts D, Wodinski I. Uptake as a determinant of the of the methotrexate response in mouse leukemia. *Science*. 1965; 150(697): 752-754.

Kessel D, Botterill V, Wodinsky I. Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemia cells as factors in drug response. *Cancer Res*. 1968; 28: 938-941.

Kirchheiner J, Klein C, Meineke I, et al. Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6. *Pharmacogenetics*. 2003; 13(10):619-626.

Klein K, Lang T, Saussele T, et al. Genetic variability of CYP2B6 in population of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15: 861-873.

Krajinovic M, Richer C, Sinnett H, et al. Genetic polymorphisms of N-acetyltransferases and gene-gene interaction in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2000; 9:557-562.

Krajinovic M, Labuda D, Mathonnet G, et al. Polymorphisms in gene encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer res*. 2002; 8: 802-810.

Krzysztof J, Balcerzak E, Smolewski P, et al. MDR1 (ABCB1) gene polymorphism C3435T is associated with P-glycoprotein activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pharmacological Reports*. 2006; 58:720-728.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A5 promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001; 27(4):383-391.

Kusuhara H, Suzuki H, Naito M, et al. Characterization of efflux transport of organic anions in a mouse brain capillary endothelial cell line. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 285:1260.

La Du BN, Aviram M, Billecke S, et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.* 1999; 119:379-388.

Lamba V, Lamba J, Yasuda K, et al. Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J pharmacol Exp Ther.* 2003; 307:906-922.

Lang T, Klein K, Fischer J, et al. Extensive genetic polymorphism in human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics.* 2001; 11:399-415.

Lang T, Klein K, Richter T, et al. Multiple novel nonsynonymous CYP2B6 gene polymorphisms in Caucasians: demonstration of phenotypic null alleles. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 311: 34-43.

Larson RA, Wang Y, Banerjee M, et al. Prevalence of the inactivating 609C3T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood.* 1999; 94:803–807.

Lee GR, Macon WR, Mccurley TL. Non-Hodgkin Lymphoma. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editores. *Wintrobe's Clinical Hematology.* 1999; 10. ed., Baltimore: Willams & Wilkins; p. 2447-2537.

Lemos MC, Cabrita FJ, Silva HA, Vivan et al. Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 e NAT2 e susceptibility to haematological neoplasias. *Carcinogenesis.* 1999; 20(7):1225-1229.

Lennert K, Feller AC. Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas. Springer Verlag: Berlin. 1992.

Leslei EM, Deeley RG, Cole SPC. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCB2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 204:216-237.

Levitt M, Marsh JC, DeConti RC, et al. Combination sequential chemotherapy in advanced reticulum cell sarcoma. *Cancer* 1972; 630-636.

Lin HJ, Han CY, Bernstein DA, et al. Ethnic distribution of the glutathione transferase MU (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and applications to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis.* 1994; 15:1077-1081.

Lockhart AC, Tirona RG, Kim RB. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. *Molecular Cancer Therapy.* 2003; 2:685-698.

Losi-Guembarovski R, Cólus IMS. Glutathione-S-transferase M1 (GSTM1): ethnic distribution and relation with cancer. *Semina: Ci Biol Saude.* 2001; 22:3-9.

Lu C, Spitz MR, Dong Q, et al. Association between Glutathione S-Transferase π polymorphisms and survival in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2006; 106(02):441-447.

Mackness B, Mackness ML, Durrington PN, et al. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 1996; 7:69-76.

Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radic Biol Med*. 2004; 37:1317-1323.

McWilliams JE, Sanderson BJ, Harris EL, et al. Glutathione-S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995; 4(6):589-594.

Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, et al. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J*. 1992; 282:305-308.

Maor I, Kaplan M, Hayek T, et al. Oxidized monocyte-derived macrophages in aortic atherosclerotic lesion from apolipoprotein E-deficient mice and from human carotid artery contain lipid peroxides and oxysterols. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 269:775-780.

Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*. 2004; 75:13-33.

Medeiros LJ, Jaffe ES. Pathology of non-Hodgkin's and Hodgkin 's disease. Neoplastic Diseases of the Blood. 3th ed. *Churchill Livingstone Inc*. 1996; 39: 753-805.

Mickley LA, Lee JS, Weng Z, et al. Genetic polymorphism in MDR1: A tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. *Blood*. 1998; 91:1749-1756.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16:1215.

Miller TP. The Limits of Limited Stage Lymphoma. *J Clin Oncol* 2004;22:2982-84.

Ministério da Saúde: Mensagem aos médicos. Câncer Fundamentos. *Secretária de Assistência Médica-Divisão Nacional de Câncer*. Brasília. 1971; p. 7-47.

Moran JL, Siegel D, Ross D. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:8150-8155.

Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006; 107:265-276.

Nakajima M, Komagata S, Fujiki Y, et al. Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2007; 17: 431-445.

Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, et al. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and *de novo* acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2000; 6:4091-4095.

Nebert DW, Mckinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA and Cell Biology*. 1996; 15:273-280.

Ng CJ, Shih DM, Hama SY, et al. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38:153-163.

Nussbaum RL, Mcinnes RR, Willard HF. *Genética Médica*, 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002; p. 219 e 274.

Ojopi EPB, Neto ED. *Genes e Câncer. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 2002; n. 27, julho/agosto.

Pakakasama S, Mukda E, Sasanakul W, et al. Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes and Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *American Journal of Hematology*. 2005; 79: 202-205.

Pauli-Magnus C, Kroetz DL. Functional Implications of Genetic Polymorphisms In The Multidrug Resistance gene MDR1 (ABCB1). *Pharmaceutical Research*. 2004; 21:904-913.

Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, et al. Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *American J Human Genetics*. 1993; 53:220-233.

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, et al. Human glutathione-S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*. 1994; 300:271-276.

Pereira FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science*. 1997; 278:1068-1073.

Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, et al. MabThera International Trial Group. Chop-like chemotherapy plus rituximab versus chop-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-b-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the mabthera international trial (mint) group. *Lancet Oncol*. 2006; 7(5):379-391.

Ramachandran G, Ramesh K, Hemanth Kumar AK, et al. Association of high T allele frequency of CYP2B6 G516T polymorphism among ethnic south Indian HIV-infected patients with elevated plasma efavirenz and nevirapine. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 841-843.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology.* 2001; 4 ed. Churchill Livingstone.

Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione-S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997; 6:733-743.

Ryberg D, Skaug V, Hewer A, et al. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis.* 1997; 18:1285-1289.

Rollinson S, Roddam P, Kane E, et al. Polymorphic variation within the glutathione-S-transferase genes and risk of adult acute leukemia. *Carcinogenesis.* 2000; 21:43-47.

Ron HN, Schaik V, Van Der Heiden IP, et al. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clinical Chemistry.* 2002; 48(10):1668-1671.

Rosenblat M, Aviram M. Oxysterol-induced activation of macrophages NADPH-oxidase enhances cell-mediated oxidation of LDL in the atherosclerotic apolipoprotein E deficient mouse: inhibitory role form vitamin E. *E Atherosclerosis.* 2002; 160:69-80.

Ross VL, Board PG, Webb GC. Chromosomal mapping of the human mu class glutathione-S-transferases to 1p13. *Genomics.* 1993; 18:87-91.

Ross DD, Doyle LA. Mining our ABCs: Pharmacogenomic approach for evaluating transporter function in cancer drug resistance. *Cancer cell.* 2004; 6:105-107.

Rubin E, Farber JL. *Patologia.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002; p. 1093 e 1103.

Rund D, Azar I, Shperling O. A mutation in the promoter of the multidrug resistance gene (MDR1) in human hematological malignancies may contribute to the pathogenesis of resistant disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1999; 457:71-75.

Saha N, Roy AC, Teo SH, et al. Influence of serum paraoxonase polymorphism on serum lipids and apolipoproteins. *Clin Genet.* 1991; 40:277-282.

Santella RM, Perera FP, Young TL, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA and Protein adducts in coal tar treated patients and controls and their

relationship to glutathione-S-transferase genotype. *Mutation Research*. 1995; 334:227-235.

Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis*. 1999; 20:1927-1931.

Savage KJ. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Oncologist* 2006; 488-495.

Schaich M, Kestel L, Pfirrmann M, et al. A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Annals of Oncology*, 2009; 20: 175-181.

Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smitt EF, et al. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol*. 2002; 55:332-339.

Schmidt R, Baumann F, Hanschmann H, et al. Gender difference in ifosfamide metabolism by human liver microsomes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2001; 26:193-200.

Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003; 43:285-307.

Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on *trans-stilbene* oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:7293-7297.

Serrato M, Marian AJ. A variant of human Paraoxonase / Arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest*. 1995; 96:3005-3008.

Shimada T, Yamazaki H, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 270:414-423.

Silveira, VS, Canelle R, Scrideli, CA, et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair genes and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Res*: 2009: 898-901.

Smith MT. Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:7624-7626.

Soucek P, Sarmanová J, Kristensen VN, et al. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Int Arch Occup Environ Health*. 2002; 75:S86-S92.

Spence RAJ, Jonhston PG. Em Oncology; Jonhston PG., ed; *Oxford University Press: Oxford*. 2001; p. 1-14.

Staratschek-Jox A, Shugart YY, Strom SS, Nagler A, Taylor GM. Genetic susceptibility to Hodgkin's lymphoma and to secondary cancer: workshop report. *An Oncol*. 2002; 13:S30-S33.

Stein U, Walther W, Wunderlich V. Point mutations within the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs. *European Journal of Cancer*. 1994; 30A:1541-1545.

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significances. *J Biol Chem*. 1997; v. 272, p. 20963-20966.

Strange RC, Matharoo B, Faulder GC, et al. The human glutathione-S-transferase: a case-control study of the incidence of the GST1 genotypes in patients with adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 1991; 12:25-28.

Stevenson F, Sahota S, Zhu D, et al. Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev*. 1998; 162:247-59.

Sweeney C, McClure GY, Fares MY, et al. Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Res*. 2000; 60: 5621-5624.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. Who – Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon, 2008: 4^o edição.

Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, et al. Association between glutathione S-transferase P1, T1 and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 936-942.

Takane H, Kobayashi D, Hirota T, et al. Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004; 311:1179-1187.

Taniguchi S, Mochida Y, Uchiumi T, et al. Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in the colon. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2003; 2:1351-1359.

Testa B. Drug Metabolism in Wolff, M. E. (Ed.); *"Burger's Medical Chemistry and Drug Discovery"*. 5^a ed., Nova York, EUA.1995; 1:129-180.

The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *New Engl J Med*. 1993; 329: 987-94.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; 84:7735-7738.

Thörn M, Finnstrom N, Lundgren S, et al. Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol*. 2005; 60:54-60.

Timm R, Kaiser R, Lotsch J, et al. Association of cyclophosphamide pharmacokinetics to polymorphic cytochrome P4502C19. *Pharmacogenomics J*: 2005; 5: 365-373.

Uyar OA, Kara M, Erol D, Ardicoglu A, Yuce. H. Investigating paraoxonase-1 gene Q192R and L55M polymorphism in patients with renal cell cancer. *Genetics and Molecular Research*. 2011; 10 (1): 133-139.

Van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*. 1996; 87:507-517.

Voso MT, D'Alo F, Putzulu R, et al. Negative prognostic value of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) deletions in adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002; 100: 2703-2707.

Voso MT, Hohaus S, Guidi F, et al. Prognostic role of glutathione S-transferase polymorphisms in acute myeloid leukemia. *Leukemia*: 2008; 00: 1-7.

Wang D, Johnson AD, Papp AC, et al. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15:693-704.

Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997; 27:161-177.

Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, et al, United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. A lack of a functional NAD(P)H:quinine oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. *Cancer Res*. 1999; 59:4095–4099.

World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica*. 2002; Nov; 12(5): 366-370.

Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450IIB1. *Mol Pharmacology*. 1990; 38:207-213.

Xie HJ, Yassar U, Lundgren S, et al. Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J*. 2003; 3:53-61.

Xie H, Griskevicius L, Stahle I, et al. Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with hematological malignancies. *Eur J Pharm*. 2006; 27: 54-61.

Yamano S, Nhamburo PT, Aoyama T, et al. cDNA cloning and sequence and cDNA-directed expression of human P450 IIB1: identification of a normal and two variant cDNAs derived from the CYP2B locus on chromosome 19 and differential expression of the IIB mRNAs in human liver. *Biochemistry*. 1989; 28:7340-7348.

Yang G, Shu XO, Ruan ZX, et al. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2005; 103: 52-58.

Yuille M, Condie A, Hudson C, et al. Relationship between glutathione-S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 99:4216-4218.

Yvonne SL, Amy LS, Dowling SD, et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacology*. 2002; 62:162-172.

Zamniak P, Nanduri B, Pikula S, et al. Naturally occurring human glutathione-S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem*. 1994; 224:863-899.

Zainuddin N. Molecular Genetics Analysis in B-cell Lymphomas. A focus on the p53 pathway and p16^{INK4a}. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, 2010.

Zhang J, Zhang J, Yuan Y. Investigation on the relationship between MDR and expression of N-glycosphingolipids in vincristine resistant KBv200 cell line. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2001; 23(2):111-114.

Zhong S, Wolf CR, Spurr NK. Chromosomal assignment and linkage analysis of the human glutathione-s-transferase μ gene (GSTM1) using intron specific polymerase chain reaction. *Human Genetics*. 1992; 90:435-439.

Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, et al. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis*. 1993a; 14:1821-1824.

Zhong S, Spurr NK, Hays JD, Wolf CR. Deduced amino acid sequence, gene structure and chromosomal location of a novel human class Mu glutathione-S-transferase, GSTM4. *Biochemical Journal*. 1993b; 291:41-50.

Zukunft J, Lang T, Richter T, et al. A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T-C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site. *Mol Pharmacol*. 2005; 67:1772-1782.