

Marta Paula Sá de Azevedo

## **Avaliação da marca epigenética H3K4me3 como biomarcador no Linfoma Difuso de Grandes Células B**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Medicina submetida ao  
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

*Orientador:* Rui Manuel Ferreira Henrique

Categoria: Doutor em Ciências Médicas

Diretor do Serviço de Anatomia Patológica do IPOFFG, EPE

Professor Catedrático Convidado do ICBAS-UP

*Co-Orientador:* Ana Margarida Dantas de Brito Rodrigues

Categoria: Mestre em Medicina

Especialista em Hematologia Clínica do IPOFFG, EPE

Doutoranda em Medicina e Oncologia Molecular da FMUP

Porto, Junho de 2015

**Introdução:** O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é o linfoma Não-Hodgkin (LNH) mais comum, constituindo cerca de 30% dos casos diagnosticados de novo em adultos e mais de 80% das neoplasias linfoides Não-Hodgkin agressivas. É reconhecido como um grupo heterogêneo de distúrbios, mas com um tratamento inicial padrão (RCHOP). O Índice de Prognóstico Internacional permite a estratificação dos doentes. No entanto, têm surgido novos marcadores de prognóstico com o estudo mais aprofundado desta neoplasia. Alterações epigenéticas têm vindo a ser demonstradas em LNH, contribuindo para a progressão da doença e constituindo potenciais alvos terapêuticos.

**Objetivo:** Avaliação da expressão da modificação epigenética pós-traducional das histonas H3K4me3 (trimetilação da lisina 4 da histona H3), e posterior correlação com os parâmetros clínicos e patológicos de forma a determinar o seu possível papel como biomarcador de prognóstico em LDGCB.

**Material e Métodos:** Foi realizado um estudo transversal retrospectivo com base em material biológico de arquivo para avaliação da imunoexpressão da marca epigenética H3K4me3 (utilizando o H-score), de 95 doentes do Instituto Português de Oncologia do Porto com diagnóstico realizado entre 2007 e 2011. Foi utilizada a base de dados do Serviço de Oncohematologia para obtenção dos dados clínicos e patológicos relevantes.

**Resultados:** Com base na análise da sobrevivência, o estadió de Ann Arbor ( $p=0,006$ ), o IPI ( $p=0,012$ ) e a idade ao diagnóstico ( $p=0,01$ ) foram confirmados como fatores de prognóstico. Na avaliação da marca epigenética H3K4me3, não se observou associação com a sobrevida global. Não foi encontrada contribuição da marca epigenética no resultado obtido na sobrevida associada às características estudadas. Quando se procedeu à análise comparativa entre o H-score e as características clínicas e patológicas, verificou-se uma relação estatisticamente significativa entre o valor deste e a idade de diagnóstico, com idade inferior a 65 anos associada a valores superiores de H-score ( $p=0,048$ ).

**Conclusões:** Nesta série, a marca epigenética H3K4me3 não revelou valor prognóstico em LDGCB. Para melhor compreensão da associação observada com a idade será necessário um alargamento do estudo, com incremento do número de casos.

**Palavras-Chave:** Linfoma não Hodgkin, Linfoma Difuso de Grandes Células B, epigenética, biomarcadores moleculares, imunocitoquímica, H3K4me3, prognóstico

## **Abstract**

**Background:** Diffuse large B-cell lymphoma is the most common subtype of non-Hodgkin lymphoma (NHL), accounting for approximately 30% of all newly diagnosed cases and more than 80% of aggressive NHL. Despite being recognized as a heterogeneous group of disorders, the initial treatment remains remarkably uniform (R-CHOP). The international prognostic index (IPI) is considered the primary clinical tool used to predict outcome, but additional prognostic markers are under scrutiny. Epigenetic changes have been demonstrated in NHL, contributing to the disease progression and constituting potential therapeutic targets.

**Objective:** Evaluation of the post-translational epigenetic mark H3K4me3 (trimethylation of lysine 4 of histone H3) through immunoexpression and correlation with clinicopathological parameters, to determine its putative relevance as prognostic biomarker.

**Methods:** A retrospective transversal study using archival biological material from 95 patients with DLBCL, diagnosed between 2007 and 2011 at the Portuguese Oncology Institute Porto, was carried out. The H3K4me3 mark was assessed by immunohistochemistry, using the H-score. Relevant clinical and pathological data was extracted from the database of the Department of Oncohematology.

**Results:** In this series, Ann Arbor stage ( $p=0,006$ ), IPI ( $p=0,012$ ) and age ( $p=0,01$ ) were associated with prognosis (global survival), as expected. H3K4me3 expression, however, was not correlated with clinical outcome. No correlation was found with other standard clinicopathological parameters. Nevertheless, when patients were stratified for age, younger age at diagnosis ( $< 65$  yrs) was associated with higher H-score for H3K4me3 ( $p<0,048$ )

**Conclusions:** In this study, no prognostic value was demonstrated for H3K4me3 immunoexpression in DLBCL. To ascertain the significance of the association between younger age at diagnosis and higher H-score, a larger study enrolling more patients, is required.

**Keywords:** Non Hodgkin Lymphoma, Diffuse large B cell lymphoma, epigenetics, molecular biomarkers, immunohistochemistry, H3K4me3, prognosis.

## **Introdução**

O Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) é o linfoma Não Hodgkin (LNH) mais comum (1), constituindo cerca de 30% dos casos diagnosticados de novo em adultos e mais de 80% das neoplasias linfoides não Hodgkin agressivas(2). A idade mediana do seu aparecimento encontra-se entre a sexta e sétima décadas de vida (3) com ligeiro predomínio no sexo masculino (55%) (4). Este linfoma é reconhecido como um grupo heterogêneo de distúrbios (2) que estudos morfológicos, biológicos e clínicos subdividiram em variantes morfológicas, subgrupos moleculares/imunofenotípicos, e entidades clínicas distintas, caracterizadas na Classificação mais recente da Organização Mundial de Saúde (2008) (2). (Anexo I)

Habitualmente surge de novo, embora possa apresentar-se como progressão ou transformação de neoplasias de células B menos agressivas como leucemia linfóide crônica, linfoma linfoplasmocítico, linfoma da zona marginal e linfoma folicular (2) (5). É também diferenciado em entidades distintas no que concerne à sua localização e, existe relação comprovada entre este tipo de linfoma e o vírus de Epstein Barr em indivíduos idosos, com inflamação crônica, Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e Doença de Castleman multicêntrica (2).

A gênese do linfoma provém de alterações na sequência de DNA por translocações cromossômicas, mutações, deleções e/ou ganhos de material genético (6),podendo resultar do bloqueio ou alteração de alguma das etapas do processo de formação e maturação de células B com rearranjos genéticos na cadeia pesada, cadeias leves e mutações somáticas na região variável da imunoglobulina (7,8).Alterações epigenéticas têm também vindo a ser demonstradas em LNH, incluindo alterações na conformação da cromatina e respetivas enzimas modificadoras. As alterações pós traducionais das histonas são modificações covalentes e não covalentes afetando resíduos de aminoácidos específicos das caudas histónicas, que estão envolvidas na regulação da expressão de genes. Estas alterações contribuem para a progressão da doença e são potenciais alvos terapêuticos (6) (9).

A nível de apresentação clínica, o LDGCB manifesta-se habitualmente como uma massa de crescimento rápido e sintomática, ganglionar ou extra-ganglionar, sendo neste caso o sistema gastrointestinal o local mais comum (40%) (10), embora possa surgir virtualmente em qualquer tecido (2).

No entanto, apesar da sua heterogeneidade, o tratamento padrão inicial em vigor é ainda homogêneo – imunoterapia com Rituximab -Ciclofosfamida-Doxorrubicina-Vincristina-Prednisona (R-CHOP) (11). Por existirem subgrupos de doentes que diferem na resposta ao tratamento, taxa de recaída e sobrevivência global, foi criado o *Índice de Prognóstico Internacional (IPI)* (12) Uma versão revista do IPI foi desenvolvida após a introdução do Rituximab no tratamento padrão (13). No entanto, após a introdução deste fármaco, a amplitude de resultados do IPI estreitou-se substancialmente com uma sobrevida livre de doença a 3 anos de 50% em doentes com 4 a 5 fatores a aproximadamente 90% em doentes sem fatores de risco, ou seja, o intervalo tornou-se próximo entre os vários grupos (14).

Ao longo dos últimos anos têm surgido novos fatores de prognóstico com o estudo mais aprofundado desta neoplasia (15). Há evidência crescente que o microambiente tumoral e a imunidade do hospedeiro apresentam um papel importante na progressão do linfoma (16–18). Recentemente, foi identificada a possível contribuição de fatores clínicos específicos que poderão contribuir para o prognóstico após terapêutica padrão: diâmetro tumoral superior a 10 cm (19), sexo masculino (20), envolvimento da medula óssea por células grandes (21) e aumento da concentração sérica de cadeias leves livres de imunoglobulina (22), identificados como fatores preditivos independentes de mau prognóstico. Através de estudos *GEP (gene expressing profiling studies)* (23), o LDGCB foi dividido em três subgrupos associados a alteração da expressão génica específica, diferentes vias de sinalização celular e diferente prognóstico (23,24), de acordo com a origem celular. Um subgrupo com expressão génica semelhante aos linfócitos do centro germinativo (GCB-LDGCB), outro com o perfil das células B periféricas ativadas (ABC – LDGCB) e um terceiro grupo, designado tipo 3, não específico (25). Rearranjos no gene BCL6 ocorrem em 20 a 40% dos casos e mutações na região 5' não codificante em cerca de 70% (26), levando à expressão inapropriadamente aumentada deste gene. Vários estudos também reportaram prognóstico reservado associado a presença de translocações envolvendo o oncogene BCL2, especialmente na era pre-rituximab (27–29). Em 5 a 15% dos casos ocorre, igualmente, translocação do gene MYC com aumento de expressão e consequente ativação de fenótipo hiperproliferativo, associado a mau prognóstico (30,31).

Uma alteração epigenética que tem sido alvo de estudo recentemente é a trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3) catalisada pela enzima EZH2, uma metiltransferase e subunidade catalítica do complexo *Polycomb2*. (32). Esta marca epigenética é repressiva e mantém o silenciamento epigenético de certos genes (33,34). Acredita-se que a expressão da EZH2 se encontra aumentada em diversos modelos tumorais,

relacionando-se com pior prognóstico por se associar a um incremento das capacidades de invasão e progressão tumoral (35–37).

Paralelamente, outra alteração epigenética, ainda sem estudos confirmativos da sua influência no LDGCB, é a trimetilação da lisina 4 da histona 3, que se associa com a ativação génica e promove a transcrição através da interação com proteínas efetoras que incluem o fator iniciador TFIID (38,39). A sua metilação é catalisada pela metiltransferase MLL (Myeloid Lymphoid Leukemia) e a desmetilação pela enzima LSD1.

## **Objetivo**

Avaliação da expressão da modificação pós traducional H3K4me3 – trimetilação da lisina 4 da histona 3 - numa amostra de doentes do Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto) com realização de tratamento padrão e acompanhamento no Serviço de Onco-hematologia, procurando verificar se existe correlação com parâmetros clínicos e patológicos, de forma a determinar o seu valor como possível biomarcador prognóstico do Linfoma Difuso de Grandes Células B.

## **Materiais e Métodos**

Para o presente estudo transversal retrospectivo foram incluídos doentes com LDGCB, diagnosticados e tratados com R-CHOP no IPO-Porto entre 2007 e 2011.

Consultou-se o processo clínico eletrónico e foi recolhida e atualizada a informação presente na base de dados disponibilizada pelo Serviço de Oncohematologia. Os dados recolhidos incluíram: género, idade, data de diagnóstico, Índice de Prognóstico Internacional, Estadio de Ann Harbor, resposta no final do tratamento, presença de recidiva e/ou progressão da doença, envolvimento extra ganglionar e data e estado do doente na última observação.

A análise de imunoexpressão foi efetuada com recurso ao microscópio ótico e um software de análise de imagem associado (GenASIs®, Applied Spectral Imaging, Israel). Este sistema permite uma análise quantitativa da expressão de proteínas presentes no núcleo de forma padronizada e reproduzível (figura 1). Foram selecionados múltiplos campos por amostra de forma a analisar entre 5 mil a 7 mil células em cada caso.

Esta análise permitiu quantificar a proporção de células marcadas, a intensidade da marcação e o Hscore (ponderação entre a percentagem de células marcadas e a

intensidade da marcação), sendo este último a variável utilizada na avaliação estatística (Anexo II).

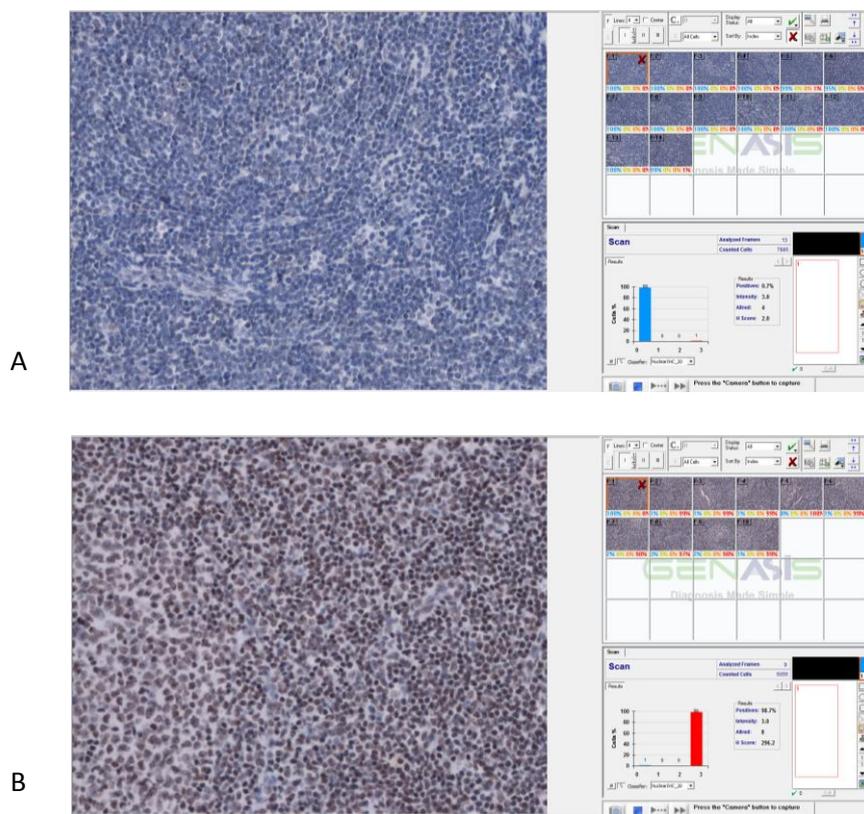


Figura 1: Análise de imunoposição com recurso ao sistema de análise de imagem GenASIS®. (A) Caso com baixa percentagem de células imunorreactivas para a marca epigenética H3K4me3. (B) Caso com forte imunoposição da marca H3K4me3.

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa informático SPSS versão 22.0 (IBM-SPSS Inc Chicago IL) procedendo-se à análise estatística descritiva da amostra com caracterização dos perfis clínicos e patológicos dos doentes. Através do Teste de Kaplan-Meier, foi realizada a análise da sobrevivência global. Foi igualmente avaliada a associação entre parâmetros clínicos e patológicos e a imunoposição de H3K4me3, aplicando-se o teste estatístico para amostras independentes (teste de Mann Whitney). O nível de significância estatística considerado foi de  $p < 0,05$ .

Este estudo encontra-se inserido no projeto de Doutoramento “Epigenética e linfomatogenese – o papel das enzimas modificadoras das histonas no Linfoma Difuso de Grandes Células B e no Linfoma Folicular” com aprovação prévia pela Comissão de Ética para a Saúde do IPO-Porto. Neste projeto, foi realizado um estudo prévio com recurso a 76 doentes do IPO-Porto que efetuaram autotransplante medular como tratamento, com

análise da expressão epigenética de H3K4me3, entre outras marcas epigenéticas. Os resultados obtidos motivaram a realização do presente estudo.

## **Resultados**

### **Caracterização Clínica dos doentes estudados**

Neste estudo foram incluídos 95 doentes com LDGCB diagnosticados e tratados com o esquema R-CHOP no IPO-Porto. As características clínicas e patológicas deste grupo de doentes são apresentadas na Tabela 1. Nesta amostra, 53% dos doentes eram do sexo masculino, com mediana de idades ao diagnóstico de 66 anos.

**Tabela 1: Características clínicas e patológicas da população estudada**

	Características dos doentes	Total	
		N	%
<b>Sexo</b>	Feminino	45	47
	Masculino	50	53
<b>Idade ao Diagnóstico</b>	<= 60 anos	34	36
	> 60 anos	61	64
<b>Estadio de Ann Arbor</b>	I/II	47	50
	III/IV	48	50
<b>IPI</b>	Baixo (0,1)	27	39
	Intermédio (2,3)	40	42
	Alto (4,5)	18	19

### **Sobrevivência Global:**

À data final de estudo e através da data da última consulta hospitalar, foi determinado o tempo de seguimento, sendo a mediana de 46 meses. Nesse momento, 60% dos doentes encontravam-se vivos e destes 3,5% com evidência de doença. Dentro dos casos falecidos, 81,6 % ocorreram com evidência da doença.

A sobrevivência global foi estimada em 80% aos 2 anos e em 60% aos 5 anos (Figura 2).

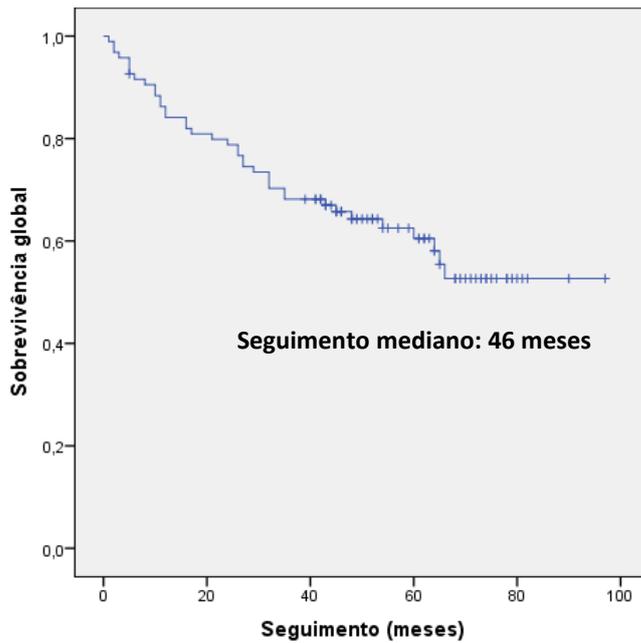
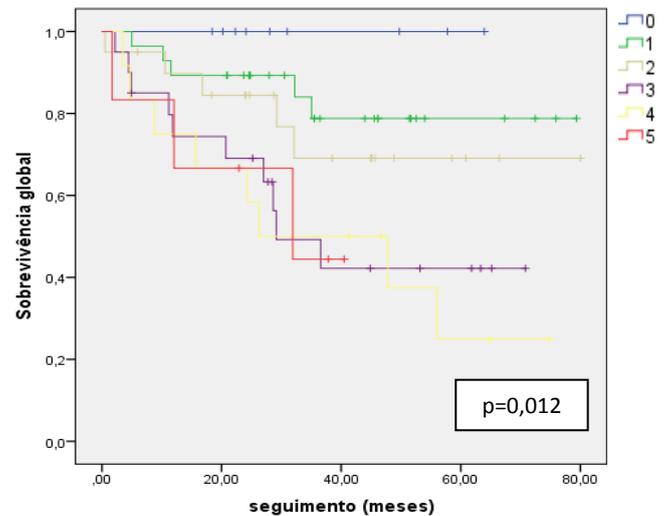
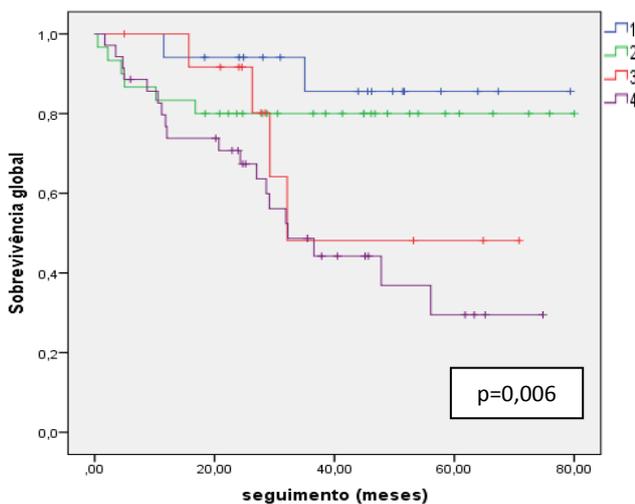


Figura 2: Análise da sobrevivência global de doentes com LDGCB

Fatores com impacto na Sobrevivência Global:

Na análise de sobrevivência realizada onde foram considerados os doentes falecidos com evidência de doença, o Índice de Prognóstico Internacional ( $p=0,012$ ), o Estadio de Ann Arbor ( $p=0,006$ ) e a idade ao diagnóstico ( $p=0,01$ ) demonstraram relação estatisticamente significativa com o prognóstico, revelando melhor sobrevida global, um estadio de Ann Arbor I/II, um IPI baixo e idade menor do que 60 anos, tal como esperado (Figura 3).



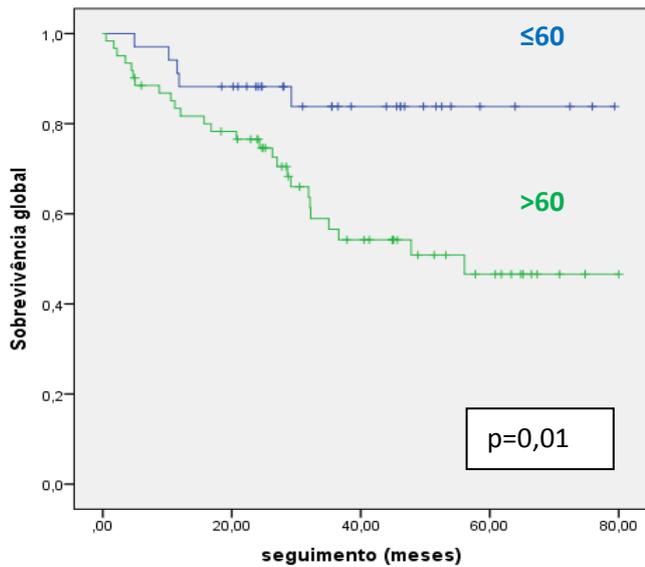


Figura 3: Análise do impacto do Estadio de Ann Arbor, IPI e idade ao diagnóstico na sobrevida global.

#### Perfil Imunocitoquímico:

A imunopositividade da marca epigenética em estudo foi verificada no núcleo das células neoplásicas (figura 4). De forma a avaliar a sua imunopositividade utilizou-se o valor obtido pelo Hscore. Neste parâmetro, o valor de cada caso variou entre 0 e 300. Na amostra em estudo, a mediana dos resultados de 109,5. (Anexo II)

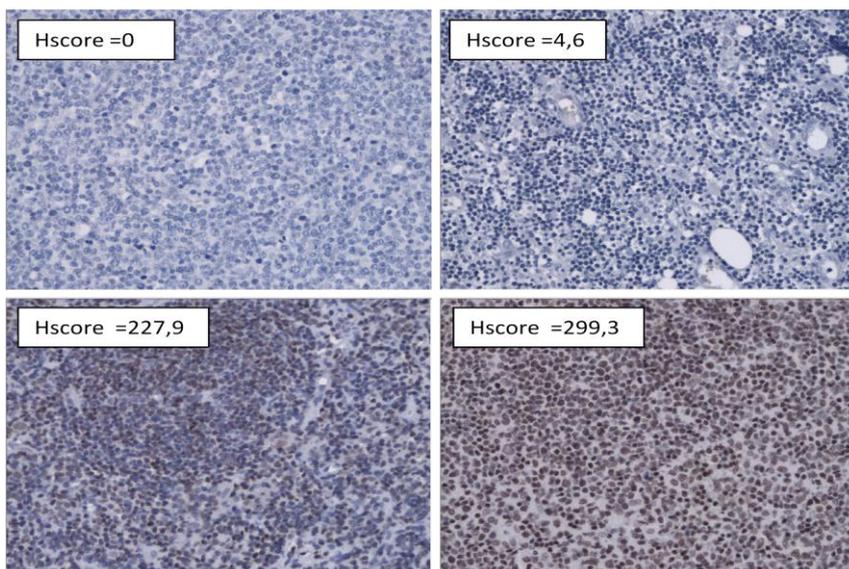


Figura 4:

Núcleos das células neoplásicas marcados com imunopositividade de H3K4me3, com valor de H score.

Na análise comparativa da distribuição do Hscore H3K4me3 de acordo com a distribuição por sexo, IPI, Estadio de Ann Arbor, idade ao diagnóstico e recidiva não se observaram diferenças estatisticamente significativas, exceto o facto de a idade inferior a 65 anos se associar de forma estatisticamente significativa ( $p=0,048$ ) com um Hscore mais elevado, através do teste de Mann Whitney. (Tabela 2)

**Tabela 2: Avaliação comparativa entre Hscore e características clínicas e patológicas**

Característica	P (<0,05)
Idade	0,048
Sexo	0,253
Estadio Ann Arbor	0,311
IPI	0,577
Recidiva	0,736

No que toca ao impacto na sobrevivência global, não foi verificada diferença significativa em função da imunexpressão de H3K4me3, tendo sido utilizado o percentil 25 e o percentil 50 dos valores no sentido de verificar uma possível relação (figura 5)

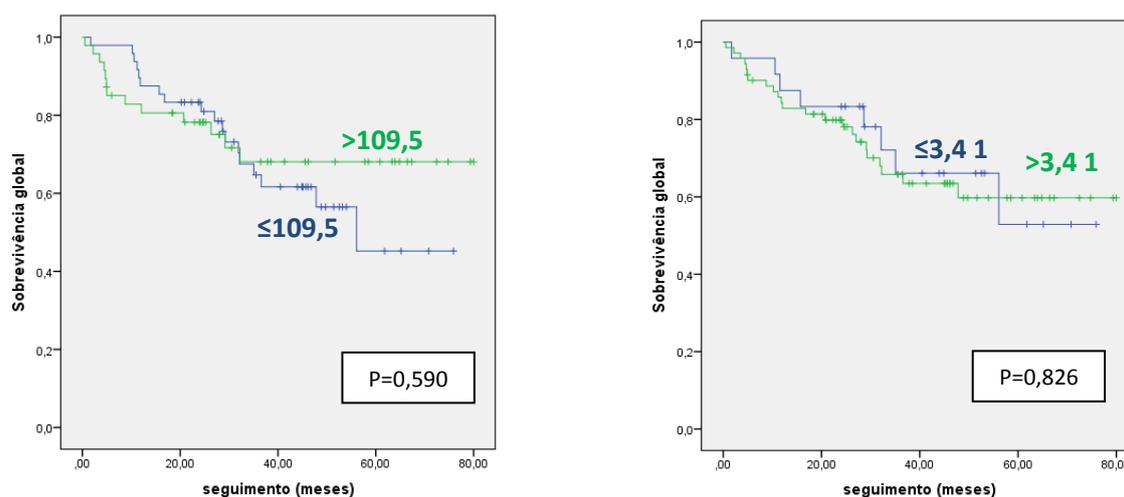


Figura 5: Análise da sobrevida para a imunexpressão da marca epigenética (H score) utilizando a mediana de valores e o percentil 25.

Avaliou-se igualmente a possibilidade do Hscore influenciar as outras características estudadas dos pacientes na sobrevida global, utilizando o percentil 25, sem evidência estatística significativa. (Tabela 3)

**Tabela 3: Influência do Hscore na sobrevida obtida pelas características clínicas e patológicas**

Característica		P (<0,05)
Idade	≤60	0,790
	>60	0,410
Sexo		0,783
Estadio Ann Arbor	I/II	0,86
	III/IV	0,341
IPI	Baixo	0,387
	Intermédio	0,246
	Alto	0,671

### **Discussão:**

Apesar da maioria dos casos ser curável com o regime R-CHOP, cerca de 40% dos casos de LDGCB sofre recidiva ou, eventualmente, progressão (40). Esta variabilidade revela a heterogeneidade biológica, patológica e clínica desta neoplasia, a qual tem sido alvo de estudo no sentido de definir uma melhor estratégia de tratamento. Historicamente, os doentes têm sido considerados como em elevado risco de falha do tratamento baseado no IPI (12). Tem ficado claro que os fatores utilizados por este sistema são em número reduzido, comparado com a diversidade de fatores existentes nesta neoplasia. Assim sendo, uma concentração de esforços é necessária para determinar a correlação molecular que define a falência terapêutica na era R-CHOP. É muito provável que esta falência não resulte numa única alteração mas que se associe a alterações numa ou mais vias de sinalização que levam a um mecanismo oncogénico dominante (41).

O presente estudo foi baseado numa série homogénea de doentes com LDGCB diagnosticados e tratados no IPO-Porto entre 2007 e 2011 com o critério de todos terem sido tratados inicialmente com R-CHOP. Na amostra estudada verificou-se uma representação equilibrada de pacientes do sexo masculino e feminino com ligeiro

predomínio do sexo masculino, em linha com o observado na generalidade das séries (4). A mediana das idades (66 anos) também se encontra entre os valores referenciados na bibliografia (3).

Com base na análise da sobrevivência, foi identificado o Estadio de Ann Arbor, o IPI e a idade ao diagnóstico como fatores associados ao prognóstico. Este resultado seria o expectável face ao descrito na literatura e, de certa forma, valida clinicamente esta série de doentes estudados. Apesar de Muller et al (2012) ter verificado, após a introdução do Rituximab, melhores resultados na sobrevida no sexo feminino quando comparado com o sexo masculino, não foi verificada diferença na sobrevida global no presente estudo (20).

Quando foi avaliada a marca epigenética H3K4me3, esta encontrou-se em níveis variáveis de expressão na amostra, mas sem relação com a sobrevida global. Igualmente não foi encontrada contribuição da marca epigenética no resultado obtido na sobrevida associada às características estudadas. Quando se procedeu à análise comparativa entre o H score e as características- Idade, IPI, estadiamento, sexo e recidiva – foi possível observar uma relação estatisticamente significativa entre o valor de H score e a idade de diagnóstico; Idade inferior a 65 anos foi associada a valor superior de H score.

O estudo desta marca epigenética iniciou-se com um estudo preliminar com recurso a 76 doentes do IPO-Porto que efetuaram auto-transplante, estando a maioria em Estadio de Ann Arbor avançado (92%) e IPI  $\geq 2$  (90%). Nessa amostra, o H3K4me3 associou-se a uma idade superior de diagnóstico e a menor número de linhas de quimioterapia pré transplante, também apresentava melhor sobrevida global acima do percentil 25. Essa população incluía além de LDGCB, também dez doentes com linfoma folicular em transformação histológica, e com mediana de idades de 51 anos (17-66 anos), ou seja, cerca de 12 anos inferior à verificada na amostra do presente estudo.

O facto de as duas populações estudadas terem características diferentes principalmente no que toca à idade de diagnóstico e gravidade da doença, leva à necessidade de uma confirmação do estudo numa população maior e homogénea. Além disso, o facto de a mediana de idades de diagnóstico no primeiro estudo ser muito mais baixa, a idade máxima ser próxima da mediana de idades do segundo estudo e o ponto de corte (65 anos) onde se verificou relação H score-idade de diagnóstico ser muito próximo da idade máxima do primeiro estudo, vem confirmar a necessidade de um terceiro estudo.

Assim, apesar de 95 doentes ser já um número considerável de casos, de forma a excluir uma associação entre esta marca epigenética e o prognóstico do LDGCB, será necessário um estudo em maior escala.

Apesar de não ter sido obtida uma conclusão relativa a uma possível associação entre esta marca epigenética e o prognóstico, é globalmente aceite que as alterações epigenéticas estão associadas a diferentes estágios da formação tumoral e progressão de várias neoplasias. Assim, anormalidades epigenéticas no carcinogénese estão a emergir como importantes biomarcadores e apresentam potencial terapêutico (42).

Até um terço dos LDGCB apresentam mutações no gene MLL2 (43), o qual codifica uma metiltransferase que catalisa à trimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me3). Apesar das consequências da mutação da MLL2 ainda não terem sido elucidadas, a maioria dos eventos gera proteínas truncadas perdendo o domínio catalítico SET, que é necessário para a sua atividade de metiltransferase. Assim, mutações na MLL2 parecem ter um efeito na desregulação da conformação da cromatina, o que pode contribuir para a reprogramação epigenética da célula precursora tumoral (37). A mutação de MLL2 com perda de função tem sido relatada na neoplasia pulmonar de pequenas células (40), no carcinoma renal (44) e em Linfomas não Hodgkin (43). A diminuição da sua atividade de metiltransferase pode levar à diminuição da marca epigenética estudada.

Por outro lado, a enzima LSD1 é responsável pela desmetilação da lisina 4 da histona 3 (além da desmetilação da H3K27me3), levando a uma diminuição da marca epigenética e promovendo o silenciamento génico (45). Os níveis de expressão da enzima LSD1 encontram-se significativamente elevados no carcinoma colo-retal, mama, próstata, bexiga e leucemia mieloide aguda (46–50).

Assim sendo, o aumento ou diminuição da expressão da marca epigenética H3K4me3 parece resultar da atividade da MLL e da LSD1. Assim, será igualmente pertinente uma avaliação conjunta da imunoexpressão da MLL e LSD1, num estudo futuro.

Uma marca epigenética já comprovadamente relacionada com o LDGCB é a H3K27me3 (51). Aproximadamente 22% dos casos de Linfoma Difuso de Grandes Células B do tipo CBG, foram encontradas mutações pontuais do domínio catalítico da EZH2 (resíduos de tirosina 641 e alanina 677) com aumento da sua atividade, o que promove a adição de grupo metil à H3K27 (52–55). Inibidores do EZH2 como o GSK126 e E11 originam uma fase de repouso no ciclo celular e apoptose em linhas celulares de LDGCB e em modelos animais (56,57). Um ensaio clínico de fase I de E7438 encontra-se neste momento em desenvolvimento nos Linfomas não Hodgkin (NCT01897571). Outras alterações epigenéticas encontram-se igualmente em estudo como potenciais alvos terapêuticos. (Anexo III)

Em conclusão, numa doença como o LDGCB que corresponde ao linfoma não Hodgkin mais comum e onde há uma elevada expectativa de remissão completa, o foco de

atenção neste momento deve concentrar-se nos obstáculos que impedem a cura de todos os pacientes que o apresentam. A descoberta de várias alterações a nível molecular tem permitido um melhor conhecimento desta neoplasia, no entanto, na maioria destas, a sua relevância clínica ainda não se encontra determinada (41). No campo da epigenética, vários estudos têm sido realizados no sentido de perceber o seu papel na evolução da linfomagénese, prognóstico e como potencial alvo terapêutico. É uma área em investigação na transversalidade das neoplasias e sobre a qual há considerações a fazer: o resultado de uma modificação epigenética está fortemente associada ao local onde ocorre no genoma (58), está associada a plasticidade (59) e são habitualmente combinatórias (60). Os recentes agentes terapêuticos direcionados para estas alterações oferecem a oportunidade de farmacologicamente reprogramar o epigenoma, no entanto requer um conhecimento molecular mais profundo e biomarcadores que guiem a sua utilização. Estudos futuros que combinem agentes alvo para diferentes componentes do código epigenético de forma rigorosa e racional poderão alterar a forma como os doentes com LDGCB são tratados (61). Estudos futuros também deverão focar-se em fatores preditivos que poderão ser usados como decisores terapêuticos.

### **Agradecimentos:**

Ao professor Rui Henrique pelo desafio e espírito crítico. À Dra Ana Margarida Rodrigues pela paciência, disponibilidade constante e pelo apoio, indispensáveis à realização deste trabalho. À minha família por me terem permitido chegar até aqui.

## **Referências Bibliográficas:**

1. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3724–34.
2. Swerdlow S, Campo E, Harris N. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid tissue. Lyon: IARC; 2008.
3. Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Aug;87(2):146–71.
4. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):265–76.
5. Chastain EC, Duncavage EJ. Clinical Prognostic Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Sep;139(5):602–7.
6. Hassler M, Schiefer A-I, Egger G. Combating the epigenome: epigenetic drugs against non-Hodgkin's lymphoma. *Epigenomics*. 2013 Aug;5(4):397–415.
7. Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K, et al. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev*. 1998 Apr;162:261–80.
8. Küppers R, Rajewsky K, Hansmann ML. Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur J Immunol*. 1997 Jun;27(6):1398–405.
9. Kurdistani SK. Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view. *Br J Cancer*. 2007 Jul 2;97(1):1–5.
10. Møller MB, Pedersen NT, Christensen BE. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation--a population-based study of 1575 cases. *Br J Haematol*. 2004 Jan;124(2):151–9.
11. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Jul 1;24(19):3121–7.
12. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 1993 Sep;329(14):987–94.
13. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1857–61.
14. Sehn LH. Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:402–9.
15. Vaidya R, Witzig TE. Prognostic Factors For Diffuse Large B Cell Lymphoma In the R(X)CHOP Era. *Ann Oncol*. 2014 Mar 13;25:109.

16. Kim DH, Baek JH, Chae YS, Kim Y-K, Kim HJ, Park YH, et al. Absolute lymphocyte counts predicts response to chemotherapy and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007 Jun 7;21(10):2227–30.
17. Oki Y, Yamamoto K, Kato H, Kuwatsuka Y, Taji H, Kagami Y, et al. Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic marker in patients with diffuse large B-cell lymphoma and suggests patients' survival benefit from rituximab. *Eur J Haematol*. 2008 Dec;81(6):448–53.
18. Wilcox RA, Ristow K, Habermann TM, Inwards DJ, Micallef INM, Johnston PB, et al. The absolute monocyte and lymphocyte prognostic score predicts survival and identifies high-risk patients in diffuse large-B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2011 Sep;25(9):1502–9.
19. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, et al. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInT) study. *Lancet Oncol*. 2008 May;9(5):435–44.
20. Müller C, Murawski N, Wiesen MHJ, Held G, Poeschel V, Zeynalova S, et al. The role of sex and weight on rituximab clearance and serum elimination half-life in elderly patients with DLBCL. *Blood*. 2012 Apr 5;119(14):3276–84.
21. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Apr 10;29(11):1452–7.
22. Maurer MJ, Micallef INM, Cerhan JR, Katzmann JA, Link BK, Colgan JP, et al. Elevated serum free light chains are associated with event-free and overall survival in two independent cohorts of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):1620–6.
23. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):503–11.
24. Bai M, Skyras A, Agnantis NJ, Kamina S, Papoudou-Bai A, Kitsoulis P, et al. B-cell Differentiation, Apoptosis and Proliferation in Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Anticancer Res*. 2005 Jan 1;25(1A):347–62.
25. Carbone A, Gloghini A, Kwong Y-L, Younes A. Diffuse large B cell lymphoma: using pathologic and molecular biomarkers to define subgroups for novel therapy. *Ann Hematol*. 2014;93(8):1263–77.
26. Migliazza A, Martinotti S, Chen W, Fusco C, Ye BH, Knowles DM, et al. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19;92(26):12520–4.
27. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, et al. Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression and Bcl-2 Gene Rearrangement in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*. 1997 Jul 1;90(1):244–51.
28. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d' Agay MF, Briere J, Lavignac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 1996 Jan 1;87(1):265–72.

29. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):1046–51.
30. Zhou K, Xu D, Cao Y, Wang J, Yang Y, Huang M. C-MYC aberrations as prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis of epidemiological studies. *PloS One*. 2014;9(4):e95020.
31. Zhang X, Zhao X, Fiskus W, Lin J, Lwin T, Rao R, et al. Coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-Cell lymphomas. *Cancer Cell*. 2012 Oct 16;22(4):506–23.
32. Hock H. A complex Polycomb issue: the two faces of EZH2 in cancer. *Genes Dev*. 2012 Apr 15;26(8):751–5.
33. Chase A, Cross NCP. Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2613–8.
34. Su I-H, Basavaraj A, Krutchinsky AN, Hobert O, Ullrich A, Chait BT, et al. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol*. 2003 Feb;4(2):124–31.
35. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002 Oct 10;419(6907):624–9.
36. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11606–11.
37. Visser HP, Gunster MJ, Kluin-Nelemans HC, Manders EM, Raaphorst FM, Meijer CJ, et al. The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2001 Mar;112(4):950–8.
38. Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, et al. Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse. *Cell*. 2005 Jan 28;120(2):169–81.
39. Lauberth SM, Nakayama T, Wu X, Ferris AL, Tang Z, Hughes SH, et al. H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell*. 2013 Feb 28;152(5):1021–36.
40. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5027–33.
41. Gascoyne RD. Summary and Future Directions. *Semin Hematol*. 2015 Apr;52(2):143–7.
42. Kondo Y. Targeting histone methyltransferase EZH2 as cancer treatment. *J Biochem (Tokyo)*. 2014 Nov;156(5):249–57.
43. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011 Aug 18;476(7360):298–303.

44. Dalglish GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*. 2010 Jan 21;463(7279):360–3.
45. Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet*. 2009 Jan;41(1):125–9.
46. Jin L, Hanigan CL, Wu Y, Wang W, Park BH, Woster PM, et al. Loss of LSD1 (lysine-specific demethylase 1) suppresses growth and alters gene expression of human colon cancer cells in a p53- and DNMT1(DNA methyltransferase 1)-independent manner. *Biochem J*. 2013 Jan 15;449(2):459–68.
47. Lim S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schüle R, Buettner R, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis*. 2010 Mar 1;31(3):512–20.
48. Willmann D, Lim S, Wetzel S, Metzger E, Jandausch A, Wilk W, et al. Impairment of prostate cancer cell growth by a selective and reversible lysine-specific demethylase 1 inhibitor. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2012 Dec 1;131(11):2704–9.
49. Hayami S, Kelly JD, Cho H-S, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, et al. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2011 Feb 1;128(3):574–86.
50. Zheng Y-C, Ma J, Wang Z, Li J, Jiang B, Zhou W, et al. A Systematic Review of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors. *Med Res Rev*. 2015 May 19;
51. Oh EJ, Yang WI, Cheong J-W, Choi S, Yoon SO. Diffuse large B-cell lymphoma with histone H3 trimethylation at lysine 27: another poor prognostic phenotype independent of c-Myc/Bcl2 coexpression. *Hum Pathol*. 2014 Oct;45(10):2043–50.
52. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. 2010 Feb;42(2):181–5.
53. Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, et al. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 7;107(49):20980–5.
54. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 21;109(8):2989–94.
55. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng S-WG, Moradian A, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2451–9.
56. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*. 2012 Oct 10;492(7427):108–12.
57. Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, Zhang R, et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Dec 26;109(52):21360–5.

58. Shen H, Laird PW. Interplay between the Cancer Genome and Epigenome. *Cell*. 2013 Mar 28;153(1):38–55.
59. Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications — miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jul;10(7):457–69.
60. Maze I, Noh K-M, Soshnev AA, Allis CD. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat Rev Genet*. 2014 Apr;15(4):259–71.
61. Jiang Y, Melnick A. The Epigenetic Basis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Semin Hematol*. 2015 Apr;52(2):86–96.

## **Anexo I: Classificação do LDGCB de acordo com a Classificação da Organização Mundial de Saúde ( 2008)**

### **-Linfoma Difuso de Grandes Células B, não especificado**

Linfoma de Grandes Células B rico em histiócitos/células T

Linfoma Difuso de Grandes Células B EBV do “idoso”

### **-Linfoma Difuso de Grandes Células B com localização extranodal predominante**

Linfoma de Grandes Células B primário do mediastino

Linfoma de Grandes Células B intravascular

Linfoma de Grandes Células B primário cutâneo, tipo perna

Linfoma de Grandes Células B primário do Sistema Nervoso Central

Granulomatose linfomatoide

### **-Linfoma de Grandes Células B de diferenciação terminal**

Linfoma de Grandes Células ALK +

Linfoma Plasmoblástico

Linfoma de efusão primária

Linfoma Difuso de Grandes Células B com inflamação crônica

### **-Neoplasias de Células B com características intermédias entre LDGCB e outros tumores linfóides**

Linfoma de Células B, não classificado, com características entre LDGCB e Linfoma de Burkitt

Linfoma de Células B, não classificado, com características entre LDGCB e Linfoma de Hodgkin

Fonte: Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. Crit Rev Oncol Hematol. 2013 Aug;87(2):149

**Anexo II: Imunoexpressão de H3K4me3 com valor Hscore de H3K4me3, número de células analisadas e percentagem de células positivas**

<b>H score</b>	<b>Células analisadas (n)</b>	<b>Células positivas (%)</b>
0,1	4948	0,0
20,0	6830	6,7
3,8	5030	1,3
0,1	6799	0,0
200,0	7146	66,7
159,3	5368	53,1
92,3	6793	30,8
3,7	5930	1,2
298,3	7002	99,4
284,7	5403	94,9
122,6	6195	40,9
159,2	7420	53,1
296,6	5928	98,9
1,5	6026	0,5
119,6	7065	39,9
13,6	7070	4,5
154,8	4951	51,6
0,0	6886	0,0
0,8	6518	0,3
37,2	6160	12,4
109,5	5444	36,5
51,6	7077	17,2
90,6	7122	30,2
65,9	5999	22,0
12,5	5607	4,2
7,4	6837	2,5
0,4	7041	0,1
0,0	5900	0,0
1,4	6971	0,5
0,3	5423	0,1
296,8	5556	98,9
252,0	5409	84,0
280,8	5634	93,6
274,0	6150	91,3
266,6	6641	88,9
217,6	5121	72,5
31,3	6975	10,4
258,4	5071	86,1
227,9	6952	76,0
14,6	7070	4,9
53,5	7201	17,8
0,0	6561	0,0
212,9	6773	71,0
206,0	5181	68,7

199,2	5092	66,4
264,9	5449	88,3
131,3	5537	43,8
299,7	5189	99,9
278,4	5208	92,8
291,0	5637	97,0
284,8	5053	94,9
219,8	6029	73,3
242,8	5045	80,9
0,5	6054	0,2
299,5	5134	99,8
265,2	6179	88,4
203,3	5331	67,8
0,8	5738	0,3
91,9	5357	30,6
3,4	5896	1,1
16,3	5593	5,4
105,1	4974	35,0
58,4	5440	19,5
1,4	5704	0,5
1,2	6133	0,4
298,9	5330	99,6
282,4	5016	94,1
297,3	5854	99,1
299,3	5747	99,8
57,2	4986	19,1
202,9	4977	67,6
298,5	5643	99,5
196,9	5346	65,6
4,3	5707	1,4
0,0	5493	0,0
0,1	5245	0,0
296,6	5462	98,9
26,5	5031	8,8
297,1	5152	99,0
0,3	5945	0,1
0,0	5899	0,0
0,6	5196	0,2
1,0	6317	0,3
297,9	5472	99,3
1,5	6035	0,5
6,1	6255	2,0
219,6	6348	73,2
0,5	5157	0,2
112,6	5204	37,5
2,4	6060	0,8
175,3	5248	58,4
296,2	5055	98,7
3,8	5338	1,3

116,4	5116	38,8
168,9	6261	56,3

### Anexo III: Agentes epigenéticos em desenvolvimento clínico

Alvo	Agente	Ensaio	
DNMTs meCpG (DNA)	Decitabine	Fase 2 (agente único) Fase 1 (combinação)	NCT00109824,NCT01799083 Com ácido valproico – NCT00109824
DNMTs meCpG(DNA) meRNA	Azacitidine	Fase 2 (agente único)	Com R-CHOP-NCT01004991 Com fenobutirato – NCT00006019
HDACs	Vorinostat	Fase 2 (agente único) Fase 1/2 (combinação)	NCT00097929 com rituximab ou quimioterapia – NCT01193842, NCT00972478 com azacitidina- NCT01120834 com decitabina- NCT00275080 com inibidores de proteossoma- NCT01276717 com lenalidomida – NCT01116154
HDACs	Panobinostat	Fase 2 (agente único) Fase 1 (combinação)	NCT01261247 Com everolimus- NCT00978432, NCT00918333, NCT00962507
HDAC1/2	Romidepsin	Fase 2	NCT00077194, NCT00383565
HDAC 1/2/3	Entinostat	Fase 1	NCT00020579 Com isotretinoína – NCT00098891
HDAC 1/2/3	Mocetinostat	Fase 1	Com azacitidina – NCT00543582
SIRT	Niacinamide	Fase 1	Com vorinostat ou vorinostat+etoposideo – NCT00691210

**Fonte:** Cerchietti L, Leonard JP. Targeting the epigenome and other new strategies in diffuse large B-cell lymphoma: beyond R-CHOP. Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2013;2013:592