Letícia Torres Ferreira

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE PLAQUETAS E miRNAs CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DE RESPOSTA TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM LINFOMA

Tese apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

São Paulo
2026

Letícia Torres Ferreira

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE PLAQUETAS E miRNAs CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DE RESPOSTA TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM LINFOMA

Tese apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Severino

São Paulo

2026

Torres Ferreira, Letícia
Perfil de expressão gênica de plaquetas e miRNAs circulantes como biomarcadores de resposta terapêutica em pacientes com linfoma / Letícia Torres Ferreira. -- São Paulo, 2026.
xiv, 79 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Platelet gene expression and circulating miRNA profiles as biomarkers of therapeutic response in lymphoma patients.*

1. Doença de Hodgkin. 2. Linfoma difuso de grandes células B. 3. Biópsia líquida. 4. microRNA circulante. 5. Plaquetas educadas pelo tumor.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Letícia Torres Ferreira

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE PLAQUETAS E miRNAs CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DE RESPOSTA TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM LINFOMA

Presidente da banca: Profa. Dra. Patricia Severino

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:
Profa. Dra. Luciana Cavalheiro Marti
Prof. Dr. Jose Mauro Kutner
Dra. Mariana Nassif Kerbauy

Membros suplentes:
Profa. Dra. Paula Sabbo Bernardo
Prof. Dr. Kenneth John Gollob

Aprovada em: 16/07/2026.

Dedicatória

Dedico este trabalho àquela que caminhou comigo em silêncio, que persistiu quando o corpo cansou e acreditou mesmo quando o caminho parecia estreito. Dedico à força que me habita e às versões de mim que ousaram ir mais fundo, que se reinventaram nas dobras do tempo e, mesmo feridas, escolheram continuar e honrar essa trajetória. A todas elas, ofereço estas páginas.

Agradecimentos

A Deus, ao universo e às forças que me sustentam, pela intuição, pela proteção e pela clareza que tantas vezes chegou quando a lógica falhou. Pela coragem de continuar mesmo nos dias mais desafiadores.

Aos meus pais e à minha família, pela base, pela confiança e pela certeza de que eu nunca estive sozinha.

À minha orientadora Patricia Severino, pela mentoria, pela confiança em mim, pela paciência nos momentos de turbulência e por acreditar no valor deste trabalho. Pela liberdade intelectual que me permitiu crescer como pesquisadora e como pessoa.

Ao Hospital Israelita Albert Einstein, instituição que sustentou minha trajetória profissional e acadêmica ao longo desses anos. Um ambiente que me desafiou, me acolheu e transformou a maneira como compreendo e respeito a oncologia.

À equipe que participou desta pesquisa, pela parceria, confiança, disposição e apoio. Agradeço em especial à Larissa Diniz, que me ensinou com paciência, me acompanhou de perto e sempre esteve disponível quando precisei.

Ao meu círculo de apoio, amigos e pessoas queridas que compreenderam minha ausência constante durante esses anos. Agradeço também à equipe da Farmácia de Oncologia, em especial a Valéria Armentano e Pollyanna Miranda, por todo apoio e pela flexibilidade na minha jornada de trabalho, que tornou este caminho possível. Cada gesto fez diferença.

Sumário

Dedicatória v
Agradecimentos vi
Lista de figuras x
Lista de tabelas xi
Lista de abreviaturas xii
Resumo xiv
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Linfoma de Hodgkin: subtipos e características moleculares 2
1.2 Linfoma difuso de grandes células B: subtipos e características moleculares 5
1.3 Principais vias moleculares envolvidas na patogênese do linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B 6
1.4 Biópsia líquida 7
1.5 microRNAs circulantes 9
1.6 Plaquetas educadas pelo tumor 12
1.7 Objetivos 17
2 MÉTODOS 18
2.1 Aspectos éticos 18
2.2 Seleção dos participantes 18
2.3 Dados clínicos, patológicos e hematológicos 19
2.4 Isolamento de plaquetas e purificação de RNA 19
2.5 Isolamento e purificação de RNA do plasma 20
2.6 Expressão gênica de plaquetas por *microarray* 21
2.6.1 Síntese da primeira fita de cDNA 22
2.6.2 Síntese da segunda fita de cDNA 22
2.6.3 Síntese do cRNA por transcrição *in vitro* 22
2.6.4 Purificação do cRNA 22
2.6.5 Avaliação do rendimento e distribuição de tamanho 23
2.6.6 Síntese de cDNA fita simples de segundo ciclo 23
2.6.7 Fragmentação e marcação do ss-cDNA 23
2.6.8 Hibridização 24
2.7 Expressão de miRNA circulantes por *microarray* 24

2.8 Análises *in silico* de predição de alvos e enriquecimento funcional.....25
2.9 Estratégia de pesquisa bibliográfica para identificação de microRNAs circulantes descritos em linfomas.....26
2.10 Análise estatística.....26
3 RESULTADOS.....28
3.1 Delineamento experimental e distribuição das coortes.....28
3.2 Perfil clínico e patológico da coorte.....29
3.3 Parâmetros hematológicos.....31
3.3.1 Comparação dos parâmetros hematológicos entre linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B.....31
3.3.2 Comparação dos parâmetros hematológicos antes e depois do tratamento no linfoma de Hodgkin.....31
3.3.3 Parâmetros hematológicos antes e depois do tratamento no linfoma difuso de grandes células B.....32
3.4 Comparação do perfil de expressão gênica de plaquetas de pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B.....33
3.5 Perfil de microRNAs circulantes de pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B.....34
3.6 Comparação dos miRNAs circulantes diferencialmente expressos com dados da literatura.....35
3.7 Análises do perfil de expressão de microRNAs circulantes no linfoma de Hodgkin 37
3.7.1 Comparação do perfil de expressão de microRNAs circulantes antes e depois do tratamento no linfoma de Hodgkin.....37
3.7.1.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes previamente descritos em linfomas nos pacientes com linfoma de Hodgkin antes e depois do tratamento.....38
3.7.2 Os dez microRNAs mais expressos em pacientes com linfoma de Hodgkin com estadiamento avançado.....40
3.7.2.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes previamente descritos em linfomas e sua associação com o estadiamento clínico no linfoma de Hodgkin.....40
3.8 Análises do perfil de expressão de microRNAs circulantes no linfoma difuso de grandes células B.....42
3.8.1 Comparação do perfil de expressão de miRNAs circulantes antes e depois do tratamento no linfoma difuso de grandes células B.....42

3.8.2 Os dez microRNAs mais expressos em pacientes com linfoma difuso de grandes células B com estadiamento avançado 42
3.8.2.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes previamente descritos em linfomas e sua associação com o estadiamento clínico no linfoma difuso de grandes células B 43
3.8.3 Os 10 microRNAs mais expressos em pacientes com desfecho desfavorável no linfoma difuso de grandes células B 45
3.8.3.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes previamente descritos em linfomas e sua associação com o desfecho clínico no linfoma difuso de grandes células B 46
3.8.3.2 Sobrevida global estratificada pela expressão de miR-15 e miR-532 em pacientes com linfoma difuso de grandes células B 46
3.9 Análise funcional dos microRNAs diferencialmente expressos 47
3.9.1 Identificação de genes-alvo e enriquecimento de vias de sinalização potencialmente reguladas pelo miRNAs diferencialmente expressos entre linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B 47
3.9.2 Identificação de genes-alvo e enriquecimento de vias de sinalização potencialmente reguladas pelo microRNAs no linfoma de Hodgkin 50
3.9.3 Identificação de genes-alvo e enriquecimento de vias de sinalização potencialmente reguladas pelo microRNAs no linfoma difuso de grandes células B 52
4 DISCUSSÃO 54
5 CONCLUSÕES 67
6 REFERÊNCIAS 69
Abstract
Apêndice

Lista de figuras

Figura 1. Características celulares do linfoma de Hodgkin 3
Figura 2. Componentes da biópsia líquida 9
Figura 3. Educação das plaquetas pelas células tumorais 15
Figura 4. Descrição das coortes e análises realizadas 29
Figura 5. Comparação dos parâmetros clínicos hematológicos entre pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B 31
Figura 6. Comparação dos parâmetros clínicos hematológicos entre pacientes com linfoma de Hodgkin antes e depois do tratamento 32
Figura 7. Comparação dos parâmetros clínicos hematológicos entre pacientes com linfoma difuso de grandes células B antes e depois do tratamento 32
Figura 8. Diagrama de Venn apresentando a distribuição dos c-miRNAs previamente descritos na literatura e que foram identificados como diferencialmente expressos no estudo 37
Figura 9. Curvas de sobrevida global estratificadas pela expressão de miR-15a-5p e miR-532-5p em pacientes com linfoma difuso de grandes células B 47
Figura 10. Enriquecimento de vias KEGG e redes de interação miRNA–gene no linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B 49
Figura 11. Genes-alvo validados e vias KEGG enriquecidas pelos miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes com linfoma de Hodgkin 51
Figura 12. Genes-alvo validados e vias KEGG enriquecidas pelos miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes com linfoma difuso de grandes células B 53

Lista de tabelas

Tabela 1. Vias moleculares envolvidas na patogênese do linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B.....7
Tabela 2. Características demográficas e clínicas dos pacientes.....30
Tabela 3. Genes diferencialmente expressos entre plaquetas de pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B.....33
Tabela 4. microRNAs circulantes diferencialmente expressos entre pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B.....34
Tabela 5. Comparação do perfil de expressão de microRNAs no plasma de pacientes com linfoma de Hodgkin antes e depois do tratamento.....38
Tabela 6. microRNAs circulantes previamente descritos na literatura e diferencialmente expressos antes e depois do tratamento do linfoma de Hodgkin.....38
Tabela 7. Os dez microRNAs diferencialmente mais expressos em pacientes com linfoma de Hodgkin classificado em estágios avançados, comparados àqueles em estágio inicial.....40
Tabela 8. microRNAs circulantes previamente descritos na literatura e diferencialmente expressos no linfoma de Hodgkin classificado em estágio avançado.....41
Tabela 9. Comparação do perfil de expressão de microRNAs no plasma de pacientes com linfoma difuso de grandes células B antes e depois do tratamento.....42
Tabela 10. Os dez microRNAs mais diferencialmente expressos em pacientes com linfoma difuso de grandes células B classificado em estágio avançado, comparados àqueles em estágio inicial.....43
Tabela 11. microRNAs circulantes previamente descritos na literatura e diferencialmente expressos no linfoma difuso de grandes células B classificado em estágio avançado .44
Tabela 12. Os dez microRNAs com maior expressão em pacientes com desfecho desfavorável no linfoma difuso de grandes células B.....45
Tabela 13. microRNAs circulantes previamente descritos na literatura e diferencialmente expressos no linfoma difuso de grandes células B com desfecho desfavorável.....46

Lista de abreviaturas

ABC	Célula B ativada (*Activated B-cell*)
Ago2	Argonauta 2
BCR	Receptor de células B (*B-cell receptor*)
c-miRNAs	miRNAs circulantes
CG	Centro germinativo
CLEC2	Receptor semelhante à lectina tipo C 2 (*C-type lectin-like receptor* 2)
CTC	Células tumorais circulantes
ctDNA	DNA tumoral circulante (*Circulating tumor* DNA)
DAVID	*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*
EBV	Epstein–Barr *virus*
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
GO	*Gene Ontology*
GPIb-IX-V	Glicoproteína Ib-IX-V
GPVI	Glicoproteína VI
HDL	Lipoproteína de alta densidade (*High-density lipoprotein*)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL	Interleucina
IPI	*International Prognostic Index*
IPS	*International Prognostic Score*
KEGG	*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LH	Linfoma de Hodgkin
LHC	Linfoma de Hodgkin clássico
LH-CM	Linfoma de Hodgkin celularidade mista
LH-DL	Linfoma de Hodgkin com depleção de linfócitos
LH-EN	Linfoma de Hodgkin esclerose nodular
LH-RL	Linfoma de Hodgkin rico em linfócitos
LHNPL	Linfoma de Hodgkin nodular com predomínio linfocitário
LMR	Relação linfócito e monócito (*Lymphocyte to monocyte ratio*)
LNH	Linfoma não Hodgkin
miRNA	microRNA

mRNA	RNA mensageiro
NK	*Natural killer*
NLR	Relação neutrófilo e linfócito (*Neutrophil to lymphocyte ratio*)
NPM1	Nucleofosmina 1
P2Y12	Receptor ADP plaquetário
PLR	Relação plaqueta e linfócito (*Platelets to lymphocyte ratio*)
pré-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primário
QC	*Quality control*
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
ss-cDNA	DNA fita simples complementar (*Single-stranded complementary* DNA)
TAC	*Transcriptome Analysis Console*
TEPs	Plaquetas educadas pelo tumor (*Tumor educated platelets*)
TPO	Trombopoetina

Resumo

Introdução: O linfoma de Hodgkin e o linfoma difuso de grandes células B apresentam heterogeneidade clínica e molecular, com limitações na estratificação prognóstica e no monitoramento terapêutico. A biópsia líquida tem emergido como abordagem, permitindo a avaliação minimamente invasiva de biomarcadores circulantes, como microRNAs e plaquetas educadas pelo tumor, capazes de refletir alterações da tumorigênese e progressão em tempo real. **Objetivo:** Investigar o potencial biomarcador da expressão de mRNAs plaquetários e de miRNAs plasmáticos no linfoma de Hodgkin e o linfoma difuso de grandes células B. **Métodos:** Amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas no diagnóstico e após o tratamento, após confirmação de remissão completa. O isolamento de plaquetas e a separação do plasma foram conduzidos para posterior extração de RNA total. As análises de expressão gênica e miRNAs circulantes foram conduzidas por técnica de microarranjos. Para a interpretação funcional, realizaram-se análises ontológicas (GO/KEGG) e identificação de alvos (DIANA-miRPath, miRWalk). **Resultados:** As análises evidenciaram um perfil molecular distinto entre linfoma de Hodgkin e o linfoma difuso de grandes células B. O perfil de miRNAs circulantes discriminou amostras pré e pós-tratamento, estágios da doença e desfechos clínicos. A integração com a literatura reforçou o potencial biomarcador desses miRNAs. No linfoma de Hodgkin, um painel de nove miRNAs (miR-146a, miR-27a, miR-22, miR-20a, let-7i, let-7a, miR-93, miR-140, miR-15a) apresentou expressão aumentada antes do tratamento. De forma consistente, miRNAs previamente descritos como superexpressos em linfomas mostraram níveis mais elevados em estágios avançados em ambos os subtipos. No linfoma difuso de grandes células B o miR-15a e miR-532 foram associados a desfecho desfavorável nos pacientes. **Conclusões:** miRNAs circulantes e mRNAs plaquetários refletem o estado fisiopatológico da doença. Esses biomarcadores apresentam potencial para complementar diagnóstico, prognóstico e monitoramento em linfomas, embora ainda demandem validação em coortes maiores.

Descritores: Doença de Hodgkin; Linfoma difuso de grandes células B; Biópsia líquida; microRNA circulante; Plaquetas educadas pelo tumor

1 INTRODUÇÃO

Os linfomas representam um grupo heterogêneo de desordens neoplásicas originadas de células do sistema linfoide. Os diferentes subtipos de linfomas refletem o processo fisiológico pelo qual precursores linfoides se diferenciam em distintos subgrupos celulares, variando em linhagem, estágio de maturação e funções imunológicas específicas frente aos desafios antigênicos.[1]

De forma ampla, os linfomas são classificados como linfoma de Hodgkin (LH) e linfoma não Hodgkin (LNH), e as diferenças entre estes dois grupos são evidentes quanto à sua apresentação clínica, tratamento, prognóstico, proporção de células neoplásicas, entre outras.[2,3] A classificação oficial dos linfomas segue um sistema estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), onde são divididos entre neoplasias derivadas de células linfoides precursoras e neoplasias derivadas de células linfoides maduras. Em seguida, cada grupo é subdividido em neoplasias originadas de células B, células T ou células *natural killer* (NK). O prognóstico dos linfomas é determinado por um conjunto de fatores clínicos, histológicos e moleculares que influenciam a resposta terapêutica e a evolução da doença.[4]

Clinicamente, muitos pacientes com linfoma podem apresentar sintomas conhecidos como sintomas B, que incluem febre inexplicada, sudorese noturna intensa e perda de peso não intencional superior a 10% do peso corporal em um período de seis meses. A presença desses sintomas possui relevância prognóstica e é utilizada na classificação clínica da doença, especialmente no estadiamento dos linfomas.[5]

Do ponto de vista epidemiológico, o LH é uma malignidade rara, representando cerca de 15% de todos os linfomas, afetando principalmente pacientes jovens. Sendo o único linfoma derivado de células B com distribuição etária bimodal, a incidência do LH apresenta um pico no início da idade adulta e um segundo pico em pacientes com mais de 60 anos.[5] O LNH, por sua vez, representa aproximadamente 70% de todos os linfomas diagnosticados globalmente,[6] refletindo sua ampla diversidade biológica. O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) corresponde ao subtipo mais prevalente, representando cerca de 30 a 60% de todos os LNHs e afetando predominantemente indivíduos acima dos 65 anos.[3,7] Embora ambos LH e LDGCB sejam originados de células B maduras, apresentam características biológicas e clínicas distintas, justificando uma descrição individualizada nas subseções seguintes.

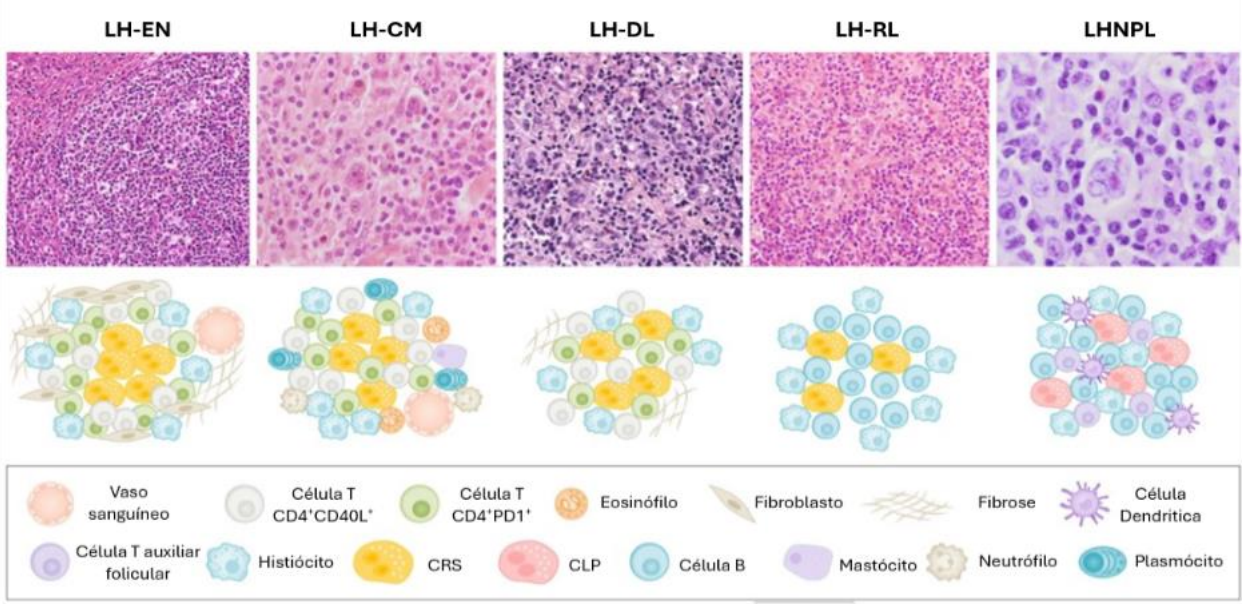
1.1 Linfoma de Hodgkin: subtipos e características moleculares

Atualmente, o LH apresenta taxas de cura de aproximadamente 90–95% nos estágios iniciais e 70–80% na doença avançada. O tratamento baseia-se em estratégias combinadas, incluindo quimioterapia multiagente, com destaque para o regime ABVD (doxorrubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina), além de radioterapia e, mais recentemente, imunoterapia, que têm demonstrado elevada eficácia. No entanto, o manejo clínico do LH ainda enfrenta o desafio de equilibrar o aumento da eficácia terapêutica, frequentemente associado a regimes mais intensivos, com o risco de complicações tardias, como cardiotoxicidade e o desenvolvimento de neoplasias secundárias. Nesse contexto, estratégias baseadas em estratificação de risco e monitoramento a longo prazo tornam-se fundamentais para otimizar os desfechos clínicos.[2]

O LH é caracterizado por uma raridade de células malignas, que são derivadas de linfócitos B, conhecidas como células de Hodgkin e células Reed-Sternberg, que geralmente estão presentes em um microambiente rico em células imunes efetoras. LH é subdividido em dois tipos histológicos principais: LH clássico (LHC) e linfoma de Hodgkin nodular com predomínio linfocitário (LHNPL).[2]

Pelo menos 90% dos pacientes apresentam a forma clássica da doença na qual as células de Hodgkin expressam o antígeno CD30 de superfície celular e estão espalhadas por um microambiente composto por células inflamatórias. O LHC inclui quatro subtipos: LH esclerose nodular (LH-EN), LH com celularidade mista (LH-CM), LH rico em linfócitos (LH-RL) e LH com depleção de linfócitos (LH-DL). Os subtipos de LHC apresentam microambientes tumoral diversos.[2]

Por outro lado, uma minoria de pacientes, ~10%, apresentam o LHNPL, que não apresenta as células Reed-Sternberg típicas, mas apresenta células predominantes linfocitárias, que se caracterizam por células maiores com núcleos multilobulados e dobrados (também conhecidas como "*popcorn cells"* ou células LP). As células LP apresentam um núcleo com múltiplos nucléolos basofílicos e menores do que os observados nas células Reed-Sternberg figura 1.[2,8]



As imagens histológicas e ilustrações, correspondem aos tipos celulares presentes no microambiente tumoral dos quatro subtipos de LHC e do LHNPL. No LH-EN, o microambiente tumoral é caracterizado por uma abundância de fibroblastos e por presença de fibrose (aumento 20X). No LH-CM, observa-se um infiltrado composto por células B e T, neutrófilos, histiócitos, plasmócitos e mastócitos (aumento 40X). No LH-DL, o microambiente tumoral é predominantemente formado por histiócitos e apresenta fibrose irregular (aumento 40X). No LH-RL, a composição do microambiente tumoral é variável, consistindo principalmente de histiócitos e linfócitos (aumento 20X). Já no LHNPL, o microambiente é semelhante ao do linfoma rico em linfócitos, mas apresenta abundância de células dendríticas foliculares (aumento 60X). LHC: linfoma de Hodgkin clássico; LHNPL: linfoma de Hodgkin nodular com predomínio linfocitário; LH-EN: linfoma de Hodgkin esclerose nodular; LH-CM: linfoma de Hodgkin celularidade mista; LH-DL: linfoma de Hodgkin com depleção de linfócitos; LH-RL: linfoma de Hodgkin rico em linfócitos.
Fonte: Traduzido de Connors JM, Cozen W, Steidl C, Carbone A, Hoppe RT, Flechtner HH, et al. Hodgkin lymphoma. Nat Rev Dis Primers. 2020;6(1):61. Fig. 1 | Morphological and cellular characteristics of Hodgkin lymphoma. p. 2. Erratum in: Nat Rev Dis Primers. 2021;7(1):79.[2]
Figura 1. Características celulares do linfoma de Hodgkin

O LHC é uma das neoplasias linfoides com maior extensão de anormalidades cromossômicas.[9] Uma característica genética exclusiva do LHC é que uma fração do clone de células Reed-Sternberg é bi ou multinucleada. A geração dessas células a partir das células mononucleares de Hodgkin acontece como consequência da citocinese incompleta e da refusão de células-filhas. As células de Hodgkin mononucleares correspondem a fração proliferativa do clone do linfoma, enquanto as células de Reed-Sternberg têm pouco potencial proliferativo.[10]

A origem celular das células de Reed-Sternberg não é totalmente clara, uma vez que essas células apresentam um imunofenótipo que não se enquadra em nenhum tipo normal de células imunológicas. Por exemplo, pela expressão do fator de transcrição de células B PAX5, mas ausência do receptor de células B (BCR - *B-cell receptor*).[11] Somente após análise genética das células de Reed-Sternberg isoladas foi possível esclarecer que essas células representam células B transformadas, pois

carregam rearranjos gênicos na região variável (V) das cadeias pesada e leve da imunoglobulina (Ig), que são específicos para células B. Além disso, a detecção de mutações somáticas nos genes IgV demonstrou uma derivação de células B do centro germinativo (CG), onde o processo de hipermutação somática, que gera tais mutações ocorre exclusivamente em células B.[11,12]

O CG são as estruturas histológicas em órgãos linfoides secundários nos quais ocorrem respostas imunes humorais dependentes de células T. No CG, as células B passam por maturação de afinidade e eventualmente se diferenciam em células plasmáticas, que secretam anticorpos de alta afinidade, ou células B de memória. Na reação do CG, as células B são ativadas pelo reconhecimento de antígeno por meio do BCR e subsequente estímulo de células T CD4+, levando à indução de MYC, um regulador de ciclo celular essencial para a formação e manutenção do CG.[13,14] A detecção de mutações destrutivas do gene IgV (por exemplo, mutações sem sentido) em um quarto dos casos de LH e o compartilhamento de padrões típicos de transcriptoma com células B CD30+, corroboram com o entendimento de uma origem durante a linfomagênese. Um cenário possível é que as células de Reed-Sternberg se desenvolvam a partir de células B do CG propensas à apoptose que conseguiram escapar do programa de morte celular programada, adquirindo algumas características-chave das células B CD30+, incluindo ativação das vias MYC, NF- B, JAK/STAT e PI3K/AKT.[11,15-18]

Enquanto as células B normais, exibem ativação da via NF-κB canônica ou não canônica de maneira transitória, as células de Reed-Sternberg mostram forte atividade concomitante de ambas as vias. A ativação constitutiva da via de NF-κB em células de Reed-Sternberg, é alcançada não apenas por várias lesões genéticas, mas também pela sinalização através dos receptores CD30 e CD40, culminando em sinais pró-sobrevivência, anti-apoptóticos e pró-proliferativos que integram a patogênese do LH.[11,19]

A sinalização de citocinas através da via JAK/STAT desempenha um papel fundamental na regulação da ativação e diferenciação de células B em respostas imunes. A ativação constitutiva da via JAK/STAT é classicamente definida como uma característica de células do LHC. Essa ativação é corroborada pela ação autócrina de interleucinas (IL5, IL6, IL7, IL13, IL15 e IL21) secretadas pelas próprias células de Reed-Sternberg. Além disso, células do microambiente tumoral contribuem para a sinalização JAK/STAT de forma parácrina.[20-23]

Consistente com esses achados, ao investigar o bloqueio de JAK/STAT com ruxolitinibe, um inibir de JAK1/2, em células de LHC, Fernández et al.[24] identificaram que a inibição conduz à ativação significativa de pontos de verificação, além da regulação negativa de genes relacionados a inflamação. Portanto, uma reversão global de diversas características fenotípicas comuns a malignidade pode ser potencialmente alcançada através do bloqueio da via JAK/STAT no LHC.[24]

A sinalização da via PI3K/AKT através da ativação do BCR, desempenha um importante papel na sobrevivência de células B maduras.[25-27] Na ausência de BCR, várias outras moléculas receptoras promovem a ativação constitutiva de PI3K/AKT em células de Reed-Sternberg, incluindo CD30, CD40 e RANK.[28]

1.2 Linfoma difuso de grandes células B: subtipos e características moleculares

O LDGCB é uma neoplasia agressiva, de crescimento rápido, cujo tratamento padrão com quimioimunoterapia baseada no regime R-CHOP (rituximabe, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona) resulta em cura em aproximadamente 60% dos pacientes. No entanto, aproximadamente 45-50% desses pacientes evoluem para recaídas, configurando um dos principais desafios oncológicos na hematologia.[3,7]

O LDGCB surge de células B maduras em vários estágios de diferenciação, durante e após a hipermutação somática no CG. Três subtipos moleculares de LDGCB são reconhecidos pela classificação da OMS com base na célula de origem: CG, célula B ativada (ABC – *activated B-cell*) e LDGCB não classificável.[29,30]

Acredita-se que o LDGCB subtipo CG derive de células linfoides que residem no CG de zona clara, como os centroblastos, portanto, expressam genes normalmente detectados em células B do CG, como CD10, LMO2 e o repressor transcricional BCL6. Por outro lado, acredita-se que o subtipo ABC derive de células B em um estágio plasmoblástico, logo antes da saída do CG e, portanto, expressam genes que são frequentemente expressos em células plasmáticas maduras. A característica patogênica do subtipo ABC é a ativação constitutiva da via de sinalização do BCR e NF-κB, que promove a sobrevivência celular, proliferação e inibição da apoptose em decorrência de mutações em CD79B e MYD88.[31]

A superexpressão da proteína antiapoptótica BCL2 pode ser vista tanto no LDGCB CG quanto no ABC, embora devido a mecanismos muito diferentes. No subtipo CG, a superexpressão é em grande parte devido à presença de translocação,[30,32] enquanto no subtipo ABC, outros mecanismos, como regulação positiva transcricional e amplificação gênica, predominam.[31] O LDGCB não classificável exibe padrões de expressão gênica distintos, que não permitem a classificação desses linfomas em subgrupo ABC ou CG.

Recentemente Schmitz et al. propuseram subtipos genéticos para o LDGCB, são eles: o subtipo MCD, subtipo BN2, subtipo N1 e subtipo EZB. Segundo os autores, esses subtipos genéticos apresentam histórias evolutivas distintas, impulsionadas pelo estágio de diferenciação das células B do qual surgem ou por seus eventos genéticos iniciais (ou ambos), o que pode influenciar a aquisição subsequente de lesões genéticas que influenciam no comportamento da doença e resposta a terapia, podendo afetar a seleção de terapias direcionadas. Os subtipos MCD e N1 foram identificados predominantemente em de LDGCB tipo casos ABC, EZB é representado principalmente por casos de LDGCB tipo CG e BN2 foi encontrado nos três subtipos de LDGCB.[33]

O subtipo MCD foi associado a mutações em MYD88 e CD79B, alterações atribuídas anteriormente ao subtipo ABC.[33,34] O subtipo BN2 está associado a ativação de NF-κB dependente do BCR, mutações em NOTCH2 e fusão de BCL6. O subtipo N1 também exibe como assinatura oncogênica, alterações em NOTCH1 e NOTCH2, apensar de diferir genética, fenotipicamente e clinicamente do BN2, sugerindo uma patogênese distinta. N1 também é caracterizado por mutações em TNFAIP3 e aumento de expressão de IRF4. O subtipo EZB foi enriquecido para a maioria dos eventos genéticos previamente atribuídos ao LDGCB de CG, incluindo translocação de BCL2 e mutação de EZH2. Além disso, o EZB exibe sinalização JAK/STAT, PI3K e mutações no gene MTOR.[33]

1.3 Principais vias moleculares envolvidas na patogênese do linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

A linfomagênese envolve a ativação ou desregulação de múltiplas vias de sinalização celular responsáveis pela proliferação, sobrevivência e evasão da

morte celular programada. Embora LH e LDGCB apresentem características biológicas distintas, diversas vias oncogênicas são compartilhadas entre esses linfomas, enquanto outras são mais características de determinados subtipos. A tabela 1 resume as principais vias moleculares envolvidas na patogênese dessas neoplasias.

Tabela 1. Vias moleculares envolvidas na patogênese do linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

Linfoma	Principais vias alteradas	Alteração	Estudo
LH	NF-κB	Ativação constitutiva independente de BCR	Weniger et al.,[11]
	JAK/STAT	Ativação constitutiva	Weniger et al.,[15]
	PI3K/AKT	Ativação constitutiva independente de BCR	Reichel et al.,[16]
	MYC	Ativação secundária às vias NF-κB ou JAK/STAT	Tiacci et al.,[17] Wienand et al.,[18]
LDGCB CG	BCL2	Superexpressão devido translocação t(14;18)	Sehn et al.,[31] Schmitz et al.,[33] Wilson et al.,[34]
	BCL6	Rearranjos ou mutações	
	EZH2	Mutações ativadoras	
	PI3K/AKT/mTOR	Ativação associada a alterações em PTEN	
LDGCB ABC	BCR	Ativação constitutiva devidos mutações em CD79B	Sehn et al.,[31] Schmitz et al.,[33] Wilson et al.,[34]
	IRF4/MUM1	Aumento de expressão	
	NF-κB	Ativação decorrente de sinalização crônica ativa do BCR e mutações em MYD88	
	BCL2	Superexpressão devido regulação transcricional e amplificação gênica	
	NOTCH 1 e NOTCH2	Mutações ativadoras	

LH: linfoma de Hodgkin; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; ABC: célula B ativada.

A complexidade genômica e heterogeneidade do ponto de vista biológico e clínico dos linfomas, justifica o crescente interesse por biomarcadores moleculares minimamente invasivos, capazes de refletir assinaturas moleculares e capturar a complexidade da doença.

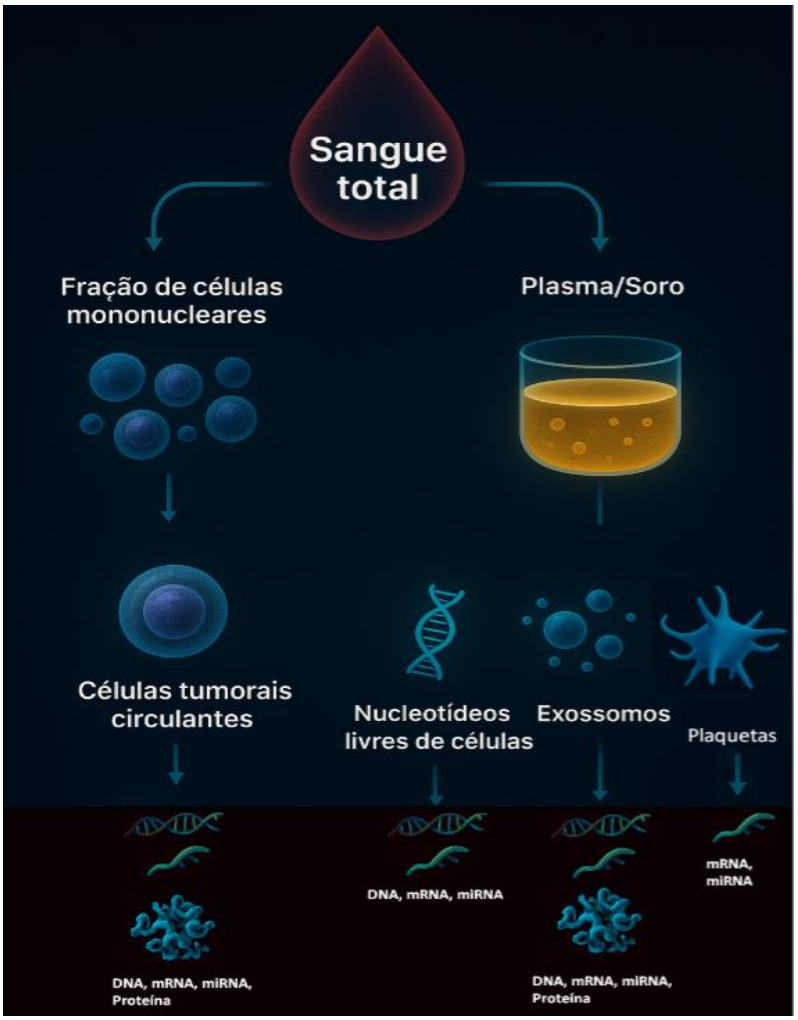
1.4 Biópsia líquida

A análise histológica e morfológica ainda permanece como padrão de diagnóstico em hematopatologia. Contudo, para a caracterização de processos linfoides neoplásicos, os hematopatologistas podem requerer testes imunofenotípicos, moleculares e citogenéticos para um diagnóstico preciso.[6]

A caracterização molecular é imprescindível para um diagnóstico adequado e tratamento individualizado, que requer conhecimento detalhado da doença.

Atualmente, essas informações são tipicamente obtidas a partir de uma biópsia tecidual. Entretanto, as biópsias são procedimentos invasivos e não permitem avaliar a heterogeneidade intratumoral. Mais recentemente, a biópsia líquida tem se destacado como uma ferramenta emergente para detectar e caracterizar tumores através de uma coleta de sangue, podendo potencialmente melhorar estas duas principais limitações da biópsia tecidual.[35]

O sangue periférico de um paciente com câncer contém um conjunto de células e/ou produtos derivados do tumor e/ou de sítios metastáticos, incluindo células tumorais circulantes (CTCs), bem como DNA tumoral circulante (ctDNA - *circulating tumor* DNA), RNAs e proteínas derivados do tumor.[35] Em contraste com a biópsia tecidual, amostras de sangue, podem ser obtidas precocemente e repetidamente de pacientes com câncer. As análises de componentes, tais como CTCs, ctDNAs, miRNAs circulantes (c-miRNAs) e plaquetas educadas pelo tumor podem, portanto, fornecer uma imagem abrangente e em tempo real das características do tumor (Figura 2). Essas informações podem ser usadas para a detecção precoce do câncer, estimar o risco de recidiva ou progressão, monitoramento em tempo real da resposta ao tratamento, identificação de alvos terapêuticos e mecanismos de resistência, além de um melhor entendimento da biologia do desenvolvimento metastático.[35-37]



O sangue pode ser separado em diferentes frações para enriquecimento em biomarcadores associados a tumores. A partir da fração de células mononucleares, as CTCs podem fornecer informações genômicas, transcriptômicas e proteômicas sobre o tumor. A partir de plasma ou soro, nucleotídeos livres de células e vesículas extracelulares podem ser usados para investigar biopartículas secretadas pelo tumor como os miRNAs, e as plaquetas carregam informações sobre o tumor no RNA mensageiro (mRNA).
Fonte: Imagem gerada por inteligência artificial a partir de dados do autor e adaptada (ChatGPT, OpenAI; 2025). Available from: https://chatgpt.com/s/m_6a06146fb2fc81919eba907bc2334a1f.
Figura 2. Componentes da biópsia líquida

1.5 microRNAs circulantes

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes, de 19 a 25 nucleotídeos de comprimento, que desempenham um papel crucial na regulação gênica pós-transcricional. A biogênese de microRNA (miRNAs) tem início com a transcrição mediada pela RNA polimerase II, originando um longo RNA de fita simples que forma

uma estrutura em grampo chamada miRNA primário (pri-miRNA). No núcleo, o pri-miRNA é clivado pelo complexo DROSHA-DGCR8 em miRNA precursor (pré-miRNA), que é então exportado para o citoplasma, em um processo mediado pela exportina 5. No citoplasma, a endoribonucleaes DICER cliva a alça do pri-miRNA para gerar um miRNA dupla fita, que é então incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) por meio da ligação com um membro da família argonauta. Uma fita do miRNA é mantida no RISC enquanto a outra fita é degradada. Os miRNAs funcionam principalmente ligando-se à 3'UTR do RNA mensageiro (mRNA) alvo em função da complementaridade de sequência. Em caso de pareamento perfeito, ocorrerá degradação do mRNA, enquanto o pareamento imperfeito resulta no sequestro do mRNA e na inibição da tradução. Dessa forma, os miRNAs modulam a expressão gênica, contribuindo para a regulação de processos biológicos.[38]

Os c-miRNAs são formas extracelulares de miRNA, detectáveis em diversos fluidos corporais, como soro, plasma, urina, líquido cefalorraquidiano e lágrimas. Desempenham um papel importante da comunicação intercelular, e podem estar circulando incorporado em vesículas extracelulares ou ligados às proteínas tais como a argonauta 2 (Ago2), lipoproteína de alta densidade (HDL - *high-density lipoprotein*) e nucleofosmina 1 (NPM1).[39]

No plasma, apresentam níveis mais elevados e estabilidade superior em comparação aos mRNAs, características que os tornam biomarcadores promissores para detecção precoce de câncer, além de potenciais indicadores prognósticos e de resposta terapêutica.[36] O estudo pioneiro que demonstrou uso de miRNAs como candidatos a biomarcadores para neoplasias hematológicas foi publicado por Lawrie et al., no qual as concentrações séricas no sangue de três miRNAs (miR-155, miR-210 e miR-21) foram comparadas em pacientes com LDGCB em comparação com controles saudáveis.[40] Desde então, o estudo dessas biomoléculas, tem sido um desenvolvimento fundamental no campo da biologia molecular, especialmente para a identificação de assinaturas de miRNAs com potencial diagnóstico precoce do câncer.[40,41]

O potencial biomarcador dos c-miRNAs é evidenciado por assinaturas capazes de detectar precocemente cânceres comumente diagnosticados em estágios avançados, tais como o câncer pancreático, carcinoma hepatocelular, câncer de pulmão de não pequenas células e neoplasias malignas do sistema nervoso central.[41] Evidências crescentes suportam o papel potencial dos c-miRNAs como biomarcadores de neoplasias hematológicas.

Um estudo retrospectivo e longitudinal que acompanhou pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), observou que o perfil de expressão do miR-20a e miR-21 foi distinto nos pacientes que desenvolveram LHC. Os níveis de miR-20a e miR-21 foram superiores antes e no momento do diagnóstico. Adicionalmente, a expressão do miR-20a foi maior naqueles indivíduos que tiveram um resultado clínico adverso após o tratamento.[42] Semelhantemente, diversos estudos têm reportado altos níveis de expressão de miR-21 circulante em pacientes com LDGCB, exibindo uma correlação com estágios avançados da doença, pior resposta ao tratamento e menor sobrevida global.[43-51]

Inúmeros c-miRNAs tais como, miR-127-3p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-24-3p e let-7a-5p, miR-494, miR-1973, apresentam maior expressão em pacientes com LH quando comparado a indivíduos saudáveis.[52,53] De acordo com Salzmann et al.,[54] os níveis de miR-122-5p plasmático no momento do diagnóstico foram significativamente maiores em pacientes recidivados com LHC.[54] Além disso, os miRNAs plasmáticos são biomarcadores promissores para a predição de resposta e detecção de pequenas lesões residuais, como observado com o miR-494, miR-1973, miR-20a, miR-127-3p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-24-3p e let-7a-5p em pacientes com LH.[42,52,53]

O miRNA-155 é amplamente conhecido por seu papel na oncogênese de neoplasias hematológicas. Pacientes com LHC apresentam expressão elevada de miR-155 circulante, sendo esse aumento mais expressivo em pacientes infectados pelo Epstein-Barr *virus* (EBV), um fator de risco importante para o desenvolvimento de linfomas.[55] No LDGCB a expressão elevada de miR-155 tem sido associada com a doença refratária, menor sobrevida e a recidiva da doença. Com isso, esses achados suportam a ideia de que o miR-155 pode ser utilizado como biomarcador prognóstico.[49-51]

Em resumo, diversos estudos (listados no apêndice 5) fornecem evidências do potencial dos c-mRNAs em complementar os ensaios diagnósticos e prognósticos atuais, contribuindo tanto para a detecção precoce da doença quanto para a identificação de pacientes com maior risco de recidiva.

Apesar desses avanços, ainda persistem lacunas importantes na literatura, incluindo a ausência de comparações diretas entre as assinaturas moleculares do LH e LDGCB, a predominância de análises focadas em subconjuntos restritos de miRNAs em vez de painéis integrados, o número ainda limitado de estudos conduzidos

com amostras de pacientes brasileiros, a inexistência de um painel molecular robusto com potencial de aplicação clínica consolidada na prática hematológica e a escassez de análises com amostras pareadas, o que limita a precisão na identificação das alterações moleculares genuinamente relacionadas ao curso da doença.

1.6 Plaquetas educadas pelo tumor

As plaquetas são células anucleadas, com forma discoide, com cerca de 1 a 3µm de diâmetro, originadas do citoplasma de megacariócitos que residem na medula óssea. Classicamente, são conhecidas por seu importante papel na hemostasia, inflamação e cicatrização.[56] Muito além das suas funções clássicas, a relação das plaquetas com o câncer tem sido extensivamente estudada, e importantes observações tem determinado o papel dessas células na biópsia líquida.

A relação entre tumores e a contagem de plaquetas tem sido estudada há décadas e estudos demonstraram uma associação entre a trombocitose e uma variedade de cânceres, sendo associada a pior prognóstico e resistência a quimioterapia. A trombocitose induzida por tumor é amplamente atribuída principalmente à produção de Interleucina (IL) 6 pelas células tumorais, que é liberado na corrente sanguínea, estimulando a geração de trombopoetina (TPO) no fígado.[57-60]

Apesar do amplo conhecimento do aumento na contagem de plaquetas em diferentes tipos de tumores sólidos, há poucos dados sobre a incidência de trombocitose em pacientes com malignidade hematológica. Randi et al. relataram dados sobre trombocitose em 18 de 101 pacientes com linfomas diagnosticados durante 3 anos de avaliação. Todos apresentaram alta contagem de plaquetas no momento do diagnóstico. A incidência de trombocitose parece ser mais frequente no sexo masculino (21,2%) do que no feminino (14,8%) e uma frequência ligeiramente maior foi encontrada na doença de Hodgkin (21,4%) do que nos linfomas não Hodgkin (16,4%).[61]

Não somente o número de plaquetas, mas também índices laboratoriais clínicos associados as plaquetas, têm sido sugeridos como biomarcadores, tais como a relação entre a contagem de plaquetas e linfócitos (PLR - *platelets to lymphocyte ratio*). Recentemente, biomarcadores inflamatórios hematológicos têm sido objeto de pesquisa do efeito da resposta inflamatória sistêmica no prognóstico em muitos tipos de câncer, incluindo LDGCB.[62-64] No LDGCB, níveis elevados de PLR e a relação

de neutrófilos e linfócitos (NLR - *neutrophil to lymphocyte ratio*) correlacionam-se com resposta à terapia, sobrevida global e livre de progressão, podendo complementar índices como o *International Prognostic Index* (IPI).[64-68]

Além da modulação da contagem de plaquetas influenciada pelo câncer, a interação plaqueta-tumor constitui um *crosstalk* bidirecional, no qual tumores modulam profundamente o fenótipo plaquetário, enquanto plaquetas favorecem a sobrevivência e disseminação tumoral.[69]

Elas participam de forma ativa em diferentes etapas do processo neoplásico, incluindo o crescimento tumoral, o extravasamento e a sobrevivência de células tumorais na circulação, a promoção da angiogênese e metástase.[70]

As primeiras observações que sugeriram uma relação entre plaquetas e câncer remontam ao século XIX. Em 1868, Trousseau[71] descreveu que a coagulação espontânea era um evento frequente em pacientes oncológicos, indicando que o sistema hemostático era profundamente afetado pela presença do tumor.[71] Posteriormente, em 1877, Billroth relatou a presença de “trombos preenchidos com elementos tumorais”, associando diretamente células neoplásicas às plaquetas no contexto da metástase.[72]

Estudos posteriores aprofundaram a compreensão dessa relação, revelando as múltiplas vias de comunicação entre megacariócitos, plaquetas e células tumorais. Esse corpo de evidências culminou no conceito de plaquetas educadas por tumor (TEPs - *tumor-educated platelets*), que descreve as alterações no perfil de RNA e no comportamento funcional das plaquetas induzidas pelo microambiente tumoral.[73]

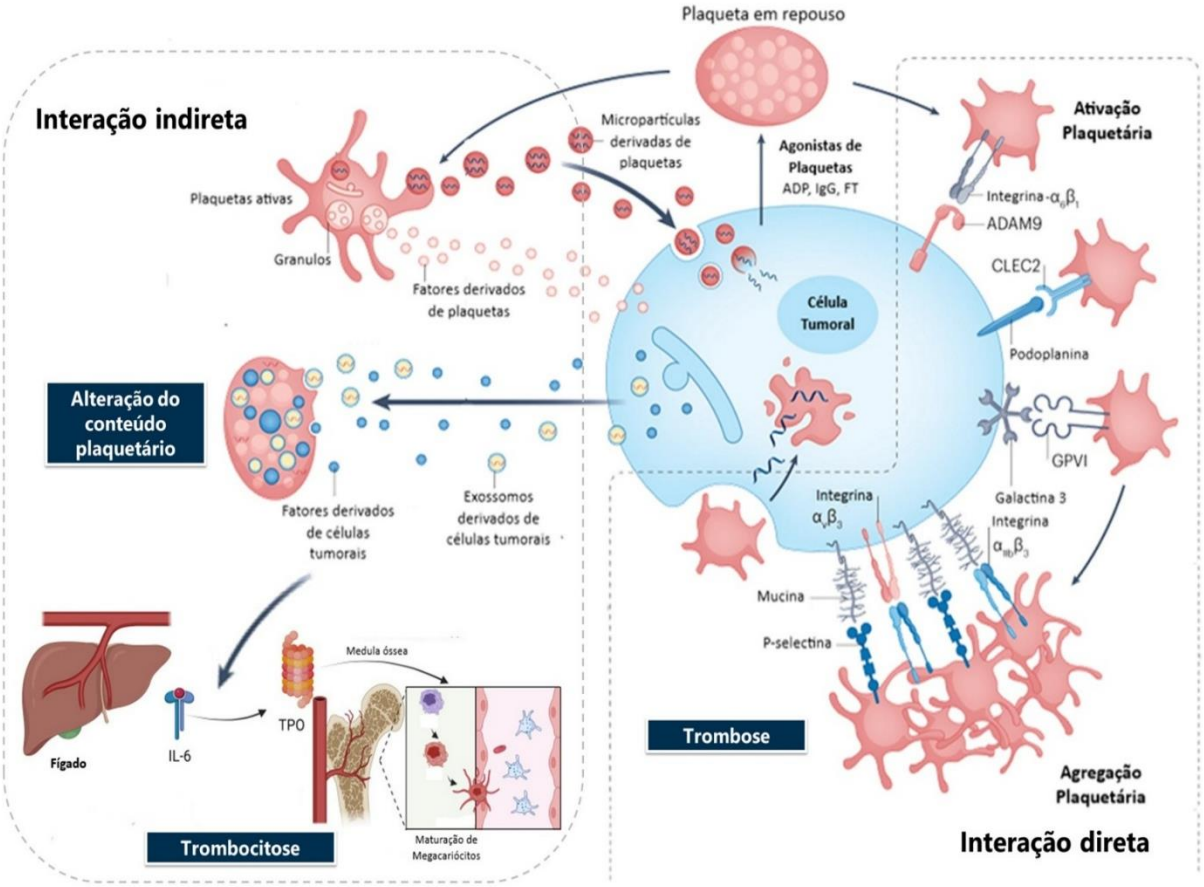
A educação das plaquetas pelas células tumorais pode ser alcançada de maneiras diretas e indiretas (Figura 3). O contato direto entre células tumorais e plaquetas promove ativação mediada por trombina através da ligação fibrinogênio/integrina αIIbβ3 e expressão de fator tissular. Ademais, as células neoplásicas induzem a secreção de ADP, promovendo a ativação do receptor ADP plaquetário (P2Y12), considerados essenciais para a manutenção da agregação plaquetária.[74-76]

Uma vez na circulação sanguínea, as plaquetas se agregam às células tumorais em menos de um minuto após a entrada destas na circulação,[77] formando microagregados que facilitam adesão, proteção contra o sistema imune e disseminação.[74,77] Receptores como integrinas, a glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V), glicoproteína VI (GPVI), glicoproteína IIb-IIIa (também conhecida como integrina αIIbβ3),

receptor semelhante à lectina tipo C 2 (CLEC2 - *C-type lectin-like receptor* 2), e P-selectinas são essenciais na formação destes agregados.[76,78]

As interações diretas também promovem endocitose plaquetária por células tumorais, fenômeno de mimetismo que confere às células malignas marcadores de plaquetas (CD61, CD42 e RGS18) e maior capacidade de proliferação, invasão e escape imune.[76,79,80]

De forma indireta, as plaquetas respondem a citocinas, quimiocinas e vesículas extracelulares liberadas tanto pelo tumor quanto pelo estroma, que modulam megacariócitos na medula óssea e alteram o conteúdo de RNA e proteínas nas plaquetas circulantes.[69,76]



As células tumorais podem estimular a produção de TPO hepática, através da secreção de IL-6. A TPO na medula óssea estimula a maturação de megacariócittos, que aderidos à parede microvascular estendem protrusões semelhantes a plaquetas. Na circulação, as proplaquetas passam por reestruturação e subsequentemente se dividem em plaquetas em repouso. As células tumorais também secretam exossomos e/ou fatores solúveis, como fatores de crescimento, que podem ser absorvidos pelas plaquetas circulantes, alterando assim os perfis de RNA e proteína plaquetários e promovendo um fenótipo nas plaquetas que favorece a progressão do tumor. Além disso, o perfil de *splicing* de RNA varia entre plaquetas de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer. Receptores como integrinas, GPVI, integrina αIIbβ3, CLEC2 e P-selectinas são essenciais para a formação de microagregados. Ademais, as células tumorais secretam agonistas plaquetários, como difosfato de adenosina (ADP) e IgG, que interagem com os receptores plaquetários para ativar as plaquetas. As células tumorais também liberam fator tissular solúvel (FT), um iniciador-chave da via de coagulação exógena, levando à geração de trombina, à formação de fibrina e consequentemente o desenvolvimento de trombose associada ao câncer.
Fonte: Traduzido e adaptado de Li S, Lu Z, Wu S, Chu T, Li B, Qi F, et al. The dynamic role of platelets in cancer progression and their therapeutic implications. Nat Rev Cancer. 2024;24(1):72-87. Fig. 2| Direct and indirect platelet-tumor cell interactions promote platelet education and activation. p. 77.[76]
Figura 3. Educação das plaquetas pelas células tumorais

O conteúdo de RNA das plaquetas é herdado dos megacariócitos ou adquiridos na circulação. Apesar de anucleadas, as plaquetas possuem DNA mitocondrial e spliceossomos funcionais, portanto, podem promover o *splicing* de pré-mRNAs em mRNA maduro, indicando um mecanismo regulatório pós-transcricional para expressão de mRNA plaquetário.[69,81,82] Estima-se que um terço de todos os genes

humanos transcritos já tenha sido identificado em plaquetas, reforçando seu potencial como fontes ricas de biomarcadores.[69]

Plaquetas de pacientes com câncer apresentam perfis de RNA distintamente alterados. Nilsson et al. demonstraram que as células tumorais transferem mRNA para plaquetas *in vitro* e *in vivo* e revelaram que as plaquetas isoladas de pacientes com glioma e câncer de próstata carregam o mRNA EGFRvIII e PCA associados ao câncer, respectivamente. Além disso, observaram uma assinatura de RNA plaquetário diferente em pacientes com glioma quando comparada a indivíduos sem câncer. Diversos outros estudos mostram assinaturas exclusivas de RNA plaquetário também no câncer de pulmão, câncer colorretal e câncer de mama com impacto em proliferação, progressão tumoral e metástase.[37,83-85]

Xing et al. identificaram o ITGA2B plaquetário como marcador promissor para identificação de pacientes com câncer e pulmão estágio I, assim como para diferenciar nódulos pulmonares malignos de benignos.[84]

No câncer colorretal, os níveis de mRNA TIMP1 são maiores em plaquetas de pacientes com câncer do que em plaquetas de voluntários saudáveis e pacientes com doenças inflamatórias intestinais. Além disso, foi demonstrado que o mRNA TIMP1 expresso em plaquetas de pacientes com câncer colorretal pode ser transportado para as células tumorais, onde promove o crescimento do tumor *in vivo* e *in vitro*. Essas descobertas mostram que o mRNA TIMP1 plaquetário é um potencial biomarcador diagnóstico independente para câncer colorretal e que as plaquetas podem transportar mRNAs para células de câncer, promovendo seu desenvolvimento e progressão.[85]

Em pacientes com câncer de mama, o perfil de expressão de genes importantes para a progressão, tais como o PF4, VEGF, PDGF, ANG-1, WASF3, LAPTM4B, TPM3 e TAC1, difere em diferentes subtipos moleculares do câncer. O gene TAC1 foi encontrado superexpresso em plaquetas, e embora não tenha sido encontrado em alta expressão no tecido tumoral, o TAC1 plaquetário permitiu identificar pacientes com câncer de mama.

A expressão de RNA em plaquetas não necessariamente reflete a sua expressão tumoral, indicando a interação das plaquetas com o microambiente tumoral, e o potencial dessas células como biomarcadores, fornecendo informações de progressão, cuja biópsia tecidual não poderia refletir.[83] Os painéis de RNA derivados de TEPs têm mostrado boa especificidade de detecção, podendo complementar as

abordagens atuais para o rastreamento do câncer baseado na biópsia líquida.[86] No entanto, apesar do avanço das pesquisas em biópsia líquida na oncologia sólida, o perfil de mRNAs plaquetários em linfomas ainda não foi explorado.

Neste estudo, investigamos os padrões de expressão de miRNAs como potenciais biomarcadores em linfomas. Para isso, analisamos amostras de plasma de pacientes com LH e LDGCB tanto no diagnóstico (pré-tratamento) quanto na remissão completa (pós-tratamento), e comparamos o perfil de expressão em diferentes estágios clínicos. De forma complementar, caracterizamos o perfil de expressão gênica em plaquetas e os miRNAs circulantes desses pacientes, buscando identificar assinaturas moleculares capazes de distinguir diferentes neoplasias de células B.

1.7 Objetivos

1. Caracterizar o perfil de miRNAs circulantes e expressão gênica de plaquetas no plasma de pacientes com linfoma antes do tratamento e após remissão completa;
2. Comparar o perfil de expressão gênica das plaquetas de pacientes com LH Ne LDGCB;
3. Comparar o perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LH e LDGCB;
4. Comparar os c-miRNAs diferencialmente expressos com dados previamente descritos na literatura;
5. Comparar o perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LH antes do tratamento e após remissão completa;
6. Comparar o perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LH em diferentes estadiamentos clínicos ao diagnóstico;
7. Comparar o perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LDGCB ao diagnóstico e após remissão completa;
8. Comparar o perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LDGCB em diferentes estadiamentos clínicos ao diagnóstico;
9. Comparar o perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com diferentes desfechos no LDGCB.

2 MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

Este estudo é considerado sub-projeto do projeto intitulado “Banco Integrado de Tumores - Base para a Pesquisa de Tradução em Oncologia por Biópsia Líquida”, coordenado pelo Dr. Nelson Hamerschlak e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Israelita Albert Einstein, CAAE 94534318.3.1001.0071. O estudo seguiu os métodos já aprovados e não houve coleta de amostras ou informações não previstas no projeto original. Adicionalmente, foi submetido de forma independente ao CEP, tendo obtido aprovação ética própria, sob o CAAE 51799921.9.0000.0071. O estudo também foi submetido e aprovado no Sistema Gerenciador de Projetos de Pesquisa (SGPP) sob o número 4849.

2.2 Seleção dos participantes

A inclusão dos participantes ocorreu de forma consecutiva, por conveniência, conforme elegibilidade, sem qualquer tipo de seleção baseada em interesses ou características específicas além dos critérios previamente estabelecidos. Como critérios de inclusão, foram considerados pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LH ou LDGCB, independentemente da classificação em subtipos específicos, que ainda não haviam iniciado tratamento no momento da coleta inicial. Os participantes foram recrutados do Hospital Israelita Albert Einstein e Hospital Municipal Vila Santa Catarina no período de janeiro de 2020 a julho de 2023. Os dados clínicos e valores laboratoriais dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos dos pacientes, que foram acompanhados ambulatorialmente após o tratamento a cada 3 ou 6 meses. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os pacientes receberam tratamento conforme protocolos padrão para linfomas, incluindo regimes baseados em quimioterapia, imunoterapia e/ou radioterapia, de acordo com as diretrizes institucionais. Em relação à primeira linha de tratamento, a maioria dos pacientes com LH recebeu o esquema ABVD, enquanto a maioria dos pacientes com LDGCB foi tratada com o esquema R-CHOP. A proporção de pacientes

que receberam linhas subsequentes de tratamento não foi avaliada, uma vez que essa variável não foi considerada nas análises do presente estudo.

As amostras de sangue periférico foram obtidas imediatamente após o diagnóstico histopatológico e antes do início do tratamento sistêmico. Para as análises longitudinais, uma segunda amostra de sangue foi obtida durante as consultas de acompanhamento de parte dos pacientes que alcançaram remissão completa e apresentaram disponibilidade para nova coleta. Apenas os pacientes com amostras disponíveis nos dois momentos foram considerados nas análises comparativas antes e após o tratamento. As demais análises foram realizadas utilizando-se as amostras obtidas na coleta inicial.

2.3 Dados clínicos, patológicos e hematológicos

As características clínico patológicas e os dados demográficos dos pacientes foram coletados de prontuários médicos, que incluem o sexo, idade, tipo de linfoma, estadiamento Ann Arbor, Índice Prognóstico Internacional (IPI - *International Prognostic Index*), Escore Prognóstico Internacional (IPS - *International Prognostic Score*) e presença de sintomas B (febre, sudorese noturna intensa e/ou perda inexplicável de peso corporal >10% nos últimos 6 meses).

As contagens de linfócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas foram obtidas a partir de dados de hemograma completo padrão antes do início de qualquer tratamento (pré-tratamento) e após evidência de remissão completa. A NLR foi calculada usando a contagem absoluta de neutrófilos, dividida pela contagem absoluta de linfócitos. A PLR foi calculada como a contagem absoluta de plaquetas, dividida pela contagem absoluta de linfócitos. A relação linfócito e monócito (LMR - *lymphocyte to monocyte ratio*) foi calculada como a contagem absoluta de linfócitos, dividida pela contagem absoluta de monócitos.

2.4 Isolamento de plaquetas e purificação de RNA

Inicialmente o sangue coletado em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*) foi

submetido a duas centrifugações de 200g por 10 minutos, para obtenção do plasma rico em plaquetas, que foi avaliado visualmente para detecção da presença de hemólise. O plasma foi novamente centrifugado, 1200g por 10 minutos, para obtenção do *pellet* de plaquetas. As plaquetas foram ressuspendidas em solução PBS contendo EDTA e albumina, seguido de centrifugação a 1200g por 5 min. Em seguida, a pureza do isolado foi avaliada por microscopia óptica em câmara de Neubauer, conforme descrito por Rolf et al.,[87] em paralelo a contagem de plaquetas, células brancas e vermelhas foi realizada por meio do analisador hematológico Sysmex XP-300®.

No momento das análises moleculares as plaquetas foram descongeladas em gelo e o RNA total foi isolado com o auxílio do *Letukocyte* RNA *purification Kit*® (Norgen, Biotek Corp; Canadá), conforme instruções do fabricante.

Inicialmente foi adicionado ao *pellet* de plaquetas 350µL de Buffer de RL contendo β-mercaptoetanol e homogeneizado em vórtex para promover lise celular. Em seguida, foram adicionados 200µL de etanol absoluto e misturado em vórtex por 10 segundos. O lisado com etanol foi transferido para a coluna e centrifugado por 1 min a 3500G, e caso de retenção de volume foi centrifugado por mais 1 min a 14000G. O fluído foi descartado e a coluna foi lavada por 3 vezes, através da adição de 400µL do tampão de lavagem (Wash Solution A) e posterior centrifugação 14000G por 1 min. Após o descarte do eluído da última lavagem, a coluna vazia foi centrifugada por 2 min a 14000G, e posteriormente transferida para um tubo de 1,5mL. Para etapa final de eluição foram adicionados 50µL de solução de eluição (Elution Solution A) na coluna, seguido de centrifugação por 2 min a 200G, e posterior centrifugação de 1 min a 14000G. O RNA foi quantificado em *NanoDrop One* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Após verificação do rendimento e qualidade do RNA, o material foi imediatamente armazenado em *freezer* -80°C.

2.5 Isolamento e purificação de RNA do plasma

O plasma previamente congelado foi centrifugado por 2 minutos a 400xg, 1mL do plasma livre de células foi transferido para um novo tudo para seguir com o isolamento de RNA utilizando o *kit Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Kit* (Norgen, Biotek Corp; Canadá), conforme instruções do fabricante. Ao plasma foram adicionados 200µL de resina (Slurry C2) e 1800µL de tampão de lise com

(Lysis Buffer A) *c*ontendo β-mercaptoetanol, posteriormente a mistura foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos e incubada por 10 min a 60°C. Após incubação, foram adicionados 3mL de etanol absoluto e misturado em vórtex por 15 segundos, seguido de centrifugação a 1000 RPM por 30 segundos. O sobrenadante foi gentilmente descartado e ao *pellet* de resina foram adicionados 300µL de *Lysis Buffer* A contendo β-mercaptoetanol, a mistura foi agitada em vórtex, seguida de incubação por 10 min a 60°C. Após incubação, 300µL de etanol absoluto foram adicionados e misturado por 15 segundos em vórtex. Posteriormente, 650µL da mistura foram transferidos para uma coluna de filtro que logo após foi centrifugada por 1 min a 14000 RPM e o fluído descartado. Esse procedimento foi repetido com o volume remanescente da mistura anterior. Após filtragem de todo conteúdo a coluna foi lavada por 3 vezes com adição de 400µL de solução de lacagem (*Wash Solution* A) e posterior centrifugação a 14000 RPM por 1 min. Finalizadas as lavagens, o fluído foi descartado e a coluna vazia foi centrifugada por 3 min a 14000 RPM. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo e 100µL de solução de eluição (*Elution Solution* A) foram adicionados. Os tubos com as colunas foram centrifugados por 2 min a 2000 RPM, seguidos de 3 min a 14000 RPM. O RNA foi quantificado em NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Após verificação do rendimento e qualidade do RNA, o material foi imediatamente armazenado em *freezer* -80°C.

2.6 Expressão gênica de plaquetas por *microarray*

A avaliação da expressão gênica foi realizada por meio de análise de *microarray.* Para tal, utilizamos o *kit* WT Plus Reagent® (Affymetrix, Santa Clara, USA) para obtenção do cDNA. O *kit* WT Plus Reagent® promove a geração de fitas *sense* de cDNA amplificadas e biotiniladas a partir do RNA total, utilizando o método de transcrição reversa de todo o comprimento da fita de RNA, incluindo mRNA poli-A e não poli-A, garantindo a cobertura completa e imparcial de todo transcriptoma. De acordo com as orientações do fabricante a concentração padronizada de RNA processadas foram de 200ng por amostra. A obtenção do cDNA das amostras processadas consistiu nas seguintes etapas:

2.6.1 Síntese da primeira fita de cDNA

Nesta etapa, o procedimento de transcrição reversa consiste no anelamento do RNA com primer contendo uma sequência promotora T7. Dessa forma, a reação sintetiza uma fita única de cDNA com uma sequência promotora T7 na extremidade 5'. Para sua realização foram utilizados os reagentes, incubações e centrifugações conforme orientação do fabricante.

2.6.2 Síntese da segunda fita de cDNA

Esta etapa consistiu na conversão da fita simples de cDNA obtida anteriormente em cDNA de fita dupla, que atua como molde para a transcrição *in vitro*. Essa reação utiliza RNase H e DNA polimerase para simultaneamente degradar e sintetizar o cDNA dupla fita. O procedimento foi realizado conforme protocolo do fabricante.

2.6.3 Síntese do cRNA por transcrição *in vitro*

Neste procedimento, o RNA antisense (RNA complementar ou cRNA) foi sintetizado e amplificado por transcrição *in vitro* da dupla fita de cDNA molde usando a RNA polimerase T7. Este método de preparo de amostras de RNA é baseado na tecnologia de transcrição *in vitro* T7 conhecida como Eberwine ou método RT-IVT.

2.6.4 Purificação do cRNA

Após a síntese de cRNA, enzimas, sais, fosfatos inorgânicos e nucleotídeos não incorporados foram removidos para preparar o cRNA para a síntese de cDNA fita simples de segundo ciclo. Para a purificação foram utilizadas *beads* (micropartículas magnéticas) que se ligam ao cRNA durante incubação. Subsequentemente os tubos das amostras incubadas com as *beads* foram colocados sobre uma placa magnética, promovendo a retenção das *beads*. Em seguida, o

sobrenadante foi descartado e realizadas 3 lavagens com etanol 80%. Após a terceira lavagem as amostras foram secas ao ar por 5 minutos. Posteriormente, o cRNA foi eluído em 27µL de água livre de nuclease (65°C) e incubado por 1 minuto. Após mistura do eluído as amostras foram colocadas novamente sobre a placa magnética, para retenção das *beads*. O sobrenadante foi então transferido cuidadosamente para um novo tubo.

2.6.5 Avaliação do rendimento e distribuição de tamanho

Para determinar a concentração do cRNA foi mensurada sua absorbância a 260nm utilizando o espectrofotômetro NanoDrop.

2.6.6 Síntese de cDNA fita simples de segundo ciclo

Nesta etapa, o DNA fita simples complementar (ss-cDNA - *Single-stranded complementary DNA*) foi sintetizado por meio da transcrição reversa de 15µg de cRNA usando *primers* de segundo ciclo, conforme instruções do fabricante. A fita *sense* de cDNA contém dUTP a uma razão fixa relativa a dTTP. Após sua síntese, foi realizada a hidrólise do cRNA por RNAse H, deixando apenas o ss-cDNA, que em seguida foi purificado (semelhantemente a etapa de purificação citada anteriormente).

2.6.7 Fragmentação e marcação do ss-cDNA

Neste procedimento, 5,5µg do ss-cDNA purificado foi fragmentado pela uracil-DNA glicosilase (UDG) e pela endonuclease apurínica/apirimidínica 1 (APE 1) em resíduos não naturais de dUTP e quebra da fita de DNA. O cDNA fragmentado foi marcado por uma transferase deoxinucleotídil terminal (TdT), usando um reagente próprio para marcação de DNA, que é covalentemente ligado a biotina, conforme recomendação do fabricante. Em seguida, o ss-cDNA foi adicionado aos reagentes de hibridação fornecidos, conforme orientação do fabricante, para obtenção do coquetel de hibridização que foi injetado no *chip*.

2.6.8 Hibridização

Depois de inserir as amostras nos *chips*, eles foram colocados nas bandejas de hibridização à 60 rpm por 16 horas à 45°C. Em seguida, o coquetel de hibridização foi removido e substituído por tampão de lavagem. Os *chips* foram então processados no equipamento GeneChip™ Scanner 3000 7G e escaneados pelo GeneChip Operating Software (GCOS). A análise dos dados obtidos foi realizada por meio do *software* Transcriptome Analysis Console ([TAC] Thermo Fisher Scientific).

2.7 Expressão de miRNA circulantes por *microarray*

A avaliação da expressão de miRNA foi realizada através de análise de *microarray* (microarranjos de DNA) Para tal, utilizamos o *kit FlashTag™ Biotin* HSR RNA *Labeling* (Affymetrix, Santa Clara, USA). De acordo com as orientações do fabricante as concentrações de RNA utilizadas foram de 200 a 400ng por amostra, que em seguida foram poliadeniladas e conjugadas. Resumidamente, uma cauda poli (A) foi adicionada nas amostras de RNA a partir de incubação a 37°C por 15 minutos, na presença de oligonucleotídeos de controle *spike-in* de RNA, tampão de reação 10x, 25 mM MnCl2, mistura de ATP e enzima PAP. Em seguida, as amostras foram conjugadas com molécula de biotina por 30 min à temperatura ambiente (25°C) usando o reagente 5X *FlashTag Biotin HSR Ligation Mix* e a enzimaT4 DNA ligase. A reação foi interrompida pela adição da solução de parada.

Amostras de RNA biotinilado (21,5µL) foram adicionadas ao coquetel de hibridização composto por uma mistura de hibridização 2x, formamida 27,5%, dimetilsulfóxido, controles de hibridização eucariótica pré-aquecidos 20 × (bioB, bioC, bioD e creX), 3nM de controle oligo B2 e água livre de nuclease. A mistura foi incubada a 99°C por 5 min e depois a 45°C por 5 min antes de ser injetada no GeneChip. Os *chips* foram incubados em estufa de hibridização por 16h protegidas da luz a 48°C com velocidade de rotação de 60 rpm. Em seguida, o coquetel de hibridização foi removido e substituído por tampão de lavagem de acordo com o protocolo usando Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450. Os chips foram então processados no equipamento GeneChip Scanner 3000 7G e escaneados pelo GCOS. A análise dos dados obtidos foi realizada por meio do *software* TAC.

2.8 Análises *in silico* de predição de alvos e enriquecimento funcional

As análises *in silico* foram conduzidas com o objetivo de identificar genes potencialmente regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos e caracterizar as vias biológicas envolvidas. A análise dos genes-alvo de miRNAs foi conduzida a partir da ferramenta de bioinformática *miRWalk* (http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/). A investigação foi realizada apenas para os principais miRNAs alterados que foram reportados na literatura de interesse. Selecionamos como filtro a espécie "*human"* e banco de dado "*miRTarBase*". Para a seleção dos alvos, foram utilizados os parâmetros padrões da ferramenta, considerando um *score* de ligação entre 0,95 e 1,0 e restringindo a busca à região 3'UTR, reconhecida como o principal sítio de ligação dos miRNAs. Como metodologias de validação foram consideradas evidências experimentais reportadas no *miRTarBase*, incluindo *luciferase reporter assay, Western blot, RT-qPCR, microarray, RNA-sequencing* e ensaios de imunoprecipitação de complexos *Argonaute* baseados em *CLIP-seq*, amplamente utilizados para confirmar interações diretas entre miRNAs e seus mRNAs alvos. Adicionalmente, para avaliação complementar e independente das vias reguladas, empregou-se o DIANA-miRPath v4.0, que permitiu a análise integrada de múltiplos miRNAs e identificação de vias da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) baseadas nas interações de miRNA e genes-alvo validados derivados da base *TarBase* v7.0. Foram incluídas apenas vias com significância estatística apresentando valor-p<0,05.

Os genes diferencialmente expressos nas plaquetas foram submetidos ao *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) *Bioinformatics Resources*, incluindo as bases de dados KEGG e *Gene Ontology* (GO), com o objetivo de identificar termos e vias significativamente enriquecidos relacionados a processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. Os termos com valor-p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Para visualização das interações e estruturação das redes regulatórias entre miRNAs e genes-alvo, utilizou-se a plataforma *Graph Commons* (http://graphcommons.com/), permitindo a construção de mapas interativos de conectividade.

2.9 Estratégia de pesquisa bibliográfica para identificação de microRNAs circulantes descritos em linfomas

Para a revisão da literatura foram utilizadas as bases de dados PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) e Embase (https://www.embase.com/). Para LH foram utilizados os descritores, *[(HL OR "Hodgkin Lymphoma") AND ("liquid biopsy") OR (HL OR "Hodgkin Lymphoma") AND (exosome OR "extracellular vesicles" OR secretome) OR (HL OR "Hodgkin Lymphoma) AND (microRNA OR miRNA or miR) AND (circulating OR "peripheral blood" OR "cell-free" OR free OR plasma OR serum) OR (DLBCL OR "Diffuse Large B-Cell Lymphoma") AND ((circulating OR "peripheral blood") AND RNA)]*. Para LDGCB foram utilizados os descritores *[(DLBCL OR "Diffuse Large B-Cell Lymphoma") AND ("liquid biopsy") OR (DLBCL OR "Diffuse Large B-Cell Lymphoma") AND (exosome OR "extracellular vesicles" OR secretome) OR (DLBCL OR "Diffuse Large B-Cell Lymphoma") AND (microRNA OR miRNA or miR) AND (circulating OR "peripheral blood" OR "cell-free" OR free OR plasma OR serum) OR (DLBCL OR "Diffuse Large B-Cell Lymphoma") AND ((circulating OR "peripheral blood") AND RNA)].*

2.10 Análise estatística

As análises dos dados dos miRNAs e mRNA obtidos por meio do *microarray* foram realizadas utilizando o *software* TAC. O TAC permite que todo o fluxo analítico seja conduzido em uma única plataforma. Inicialmente, os arquivos .CEL foram importados e submetidos aos procedimentos de *quality control* (QC). As métricas avaliadas incluíram distribuição dos sinais de expressão, intensidade média, controle de hibridização e variações. A subtração de *background*, a normalização por quantis e a transformação logarítmica em base 2 dos sinais gênicos foram realizadas pelo algoritmo Robust Multi-array Average (RMA), conforme descrito por Irizarry et al.[88] Para a identificação de genes diferencialmente expressos entre os grupos estudados, utilizou-se o módulo estatístico baseado no pacote *Linear Models for Microarray Data* (LIMMA), integrado ao TAC.[88] Foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram valor-p ajustado < 0,05 e *fold change* significativo de acordo com os critérios adotados.

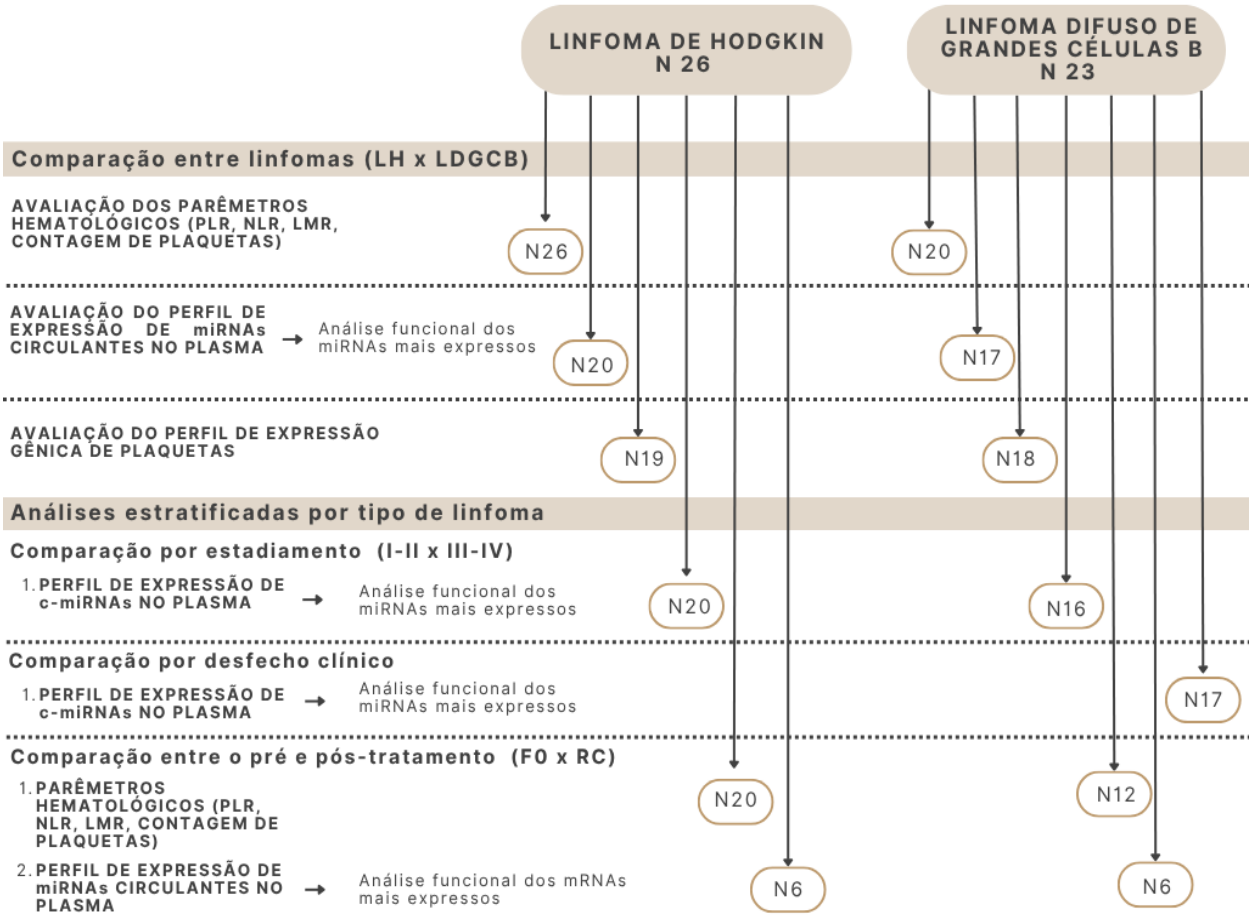
Para a análise da expressão diferencial, tanto de miRNAs como de mRNA, embora a correção por FDR tenha sido calculada, foram considerados significativos os genes com $p<0,05$ devido ao baixo N amostral, conforme práticas aceitáveis para estudos exploratórios. Para as análises dos dados clínicos, foram utilizados teste *t* de Student ou testes não-paramétricos, teste de Spearman ou teste de Pearson de acordo com a distribuição das variáveis, utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism versão 9.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Delineamento experimental e distribuição das coortes

A coorte do estudo e o fluxo das análises realizadas estão apresentados na figura 4. Foram incluídos 26 pacientes com LH e 23 com LDGCB, sendo as amostras distribuídas conforme a disponibilidade para cada etapa do estudo.

Inicialmente, foram realizadas comparações entre os subtipos de linfoma, incluindo a avaliação de parâmetros hematológicos (PLR, NLR, LMR e contagem de plaquetas), perfil de expressão de miRNAs circulantes no plasma e expressão gênica em plaquetas. Adicionalmente, foram conduzidas análises estratificadas por tipo de linfoma, incluindo comparações por estadiamento clínico (I–II *versus* III–IV), desfecho clínico e avaliação pré-tratamento (F0) após remissão completa (RC) (F0 *versus* RC).



Distribuição dos pacientes com LH (n=26) e LDGCB (n=23), bem como as análises conduzidas em cada grupo. Para cada etapa, são indicados os tamanhos amostrais correspondentes (N), que variam de acordo com a disponibilidade de dados e amostras biológicas em cada análise.
Figura 4. Descrição das coortes e análises realizadas

3.2 Perfil clínico e patológico da coorte

Um total de 49 pacientes foram recrutados, 26 pacientes foram diagnosticados com LH e 23 pacientes foram diagnosticados com LDGCB. Entre os pacientes com LH, 11 eram homens e 15 mulheres, a idade mediana foi de 36 anos. Um total de 16 (61,5%) apresentavam sintomas B. O número de pacientes em estágio clínico II, III e IV foi de 8 (30,8%), 3 (11,5%), 13 (50%), respectivamente. De acordo com o *score* de estratificação de risco IPS, 9 (34,6%) apresentavam linfoma de baixo risco, 3 (11,5%) risco intermediário baixo, 2 (7,7%) risco intermediário alto e 6 (23,1%) apresentavam linfoma de alto risco.

Dos pacientes com linfoma difuso de grandes células B, 13 (56,5%) eram homens e 10 (43,5%) eram mulheres e a idade mediana foi de 66 anos. Dez pacientes (43,5%) apresentavam sintomas B. Em relação ao estadiamento, 2 (8,7%)

apresentavam linfoma estágio I, 4 (17,4%) estágio II, 1 (4,3%) estágio III e 14 (60,9%) apresentavam estágio IV. O risco prognóstico dos pacientes foi avaliado pelo IPI, 3 (13%) pacientes apresentavam baixo risco, 3 (13%) risco intermediário baixo, 9 (39,1%) apresentavam risco intermediário alto e 6 (26,1%) pacientes apresentavam linfoma de alto risco. A mediana do tempo de acompanhamento foi de 41 meses, com uma variação de 24 a 66 meses. As características dos pacientes foram listadas na tabela 2.

Tabela 2. Características demográficas e clínicas dos pacientes

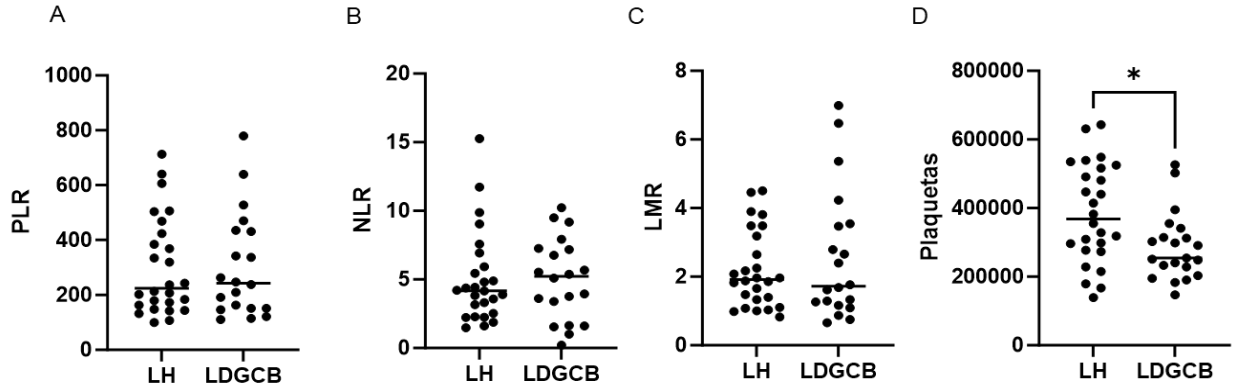
Características	**LH (n=26)**	**LDGCB (n=23)**
Idade, mediana (intervalo)	36 (18-63)	66 (20-88)
Gênero, n (%)		
Masculino	11(42,3)	13 (56,5)
Feminino	15 (57,7)	10 (43,5)
Estágio clínico, n (%)		
I	-	2 (8,7)
II	8 (30,8)	4 (17,4)
III	3 (11,5)	1 (4,3)
IV	13 (50)	14 (60,9)
Desconhecido	2 (7,7)	2 (8,7)
Sintomas B, n (%)		
Sim	16 (61,5)	10 (43,5)
Não	8 (30,8)	11 (47,8)
Desconhecido	2 (7,7)	2 (8,7)
Estratificação de risco, n (%)	IPS	IPI
Baixo (0–1)	9 (34,6)	3 (13)
Intermediário baixo (2)	3 (11,5)	3 (13)
Intermediário alto (3)	2 (7,7)	9 (39,1)
Alto (4–5)	6 (23,1)	6 (26,1)
Desconhecido	6 (23,1)	2 (8,7)
Evolução clínica, n (%)		
Remissão completa	25 (96)	15 (65)
Recaída	2 (7,7)	3 (13)
Doença refratária	-	2 (8,7)
Óbito relacionado a doença	-	7 (30,4)
Perda de seguimento	1 (4)	1 (4,3)

LH: linfoma de Hodgkin; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; IPS: *International Prognostic Score*; IPI: *International Prognostic Index*.

3.3 Parâmetros hematológicos

3.3.1 Comparação dos parâmetros hematológicos entre linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

Para avaliar se o tipo de linfoma pode influenciar nos parâmetros hematológicos dos pacientes diagnosticados, nós comparamos os valores de PLR, NLR, LMR e contagem de plaquetas antes do tratamento. Não houve diferença nas razões avaliadas (PLR, NLR e LMR). Entretanto os pacientes diagnosticados com LH apresentaram contagem de plaquetas superiores quando comparados aos pacientes diagnosticados com LDGCB (Figura 5).

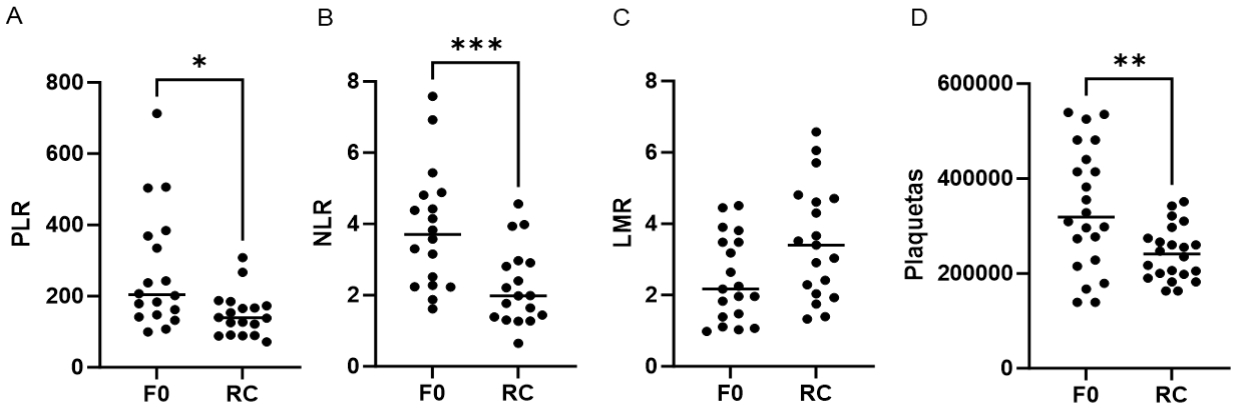


(A) Razão de plaquetas e linfócitos PLR. (B) Razão de neutrófilos e linfócitos NLR. (C) Razão de linfócitos e monócitos LMR. (D) Contagem total de plaquetas, obtidas antes do início do tratamento ($p<0,05$; teste de Mann–Whitney). PLR: relação plaqueta e linfócito; NLR: relação neutrófilo e linfócito; LMR: relação linfócito e monócito.

Figura 5. Comparação dos parâmetros clínicos hematológicos entre pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

3.3.2 Comparação dos parâmetros hematológicos antes e depois do tratamento no linfoma de Hodgkin

Para determinar o impacto da presença do tumor nos parâmetros hematológicos nós realizamos análises antes do tratamento e após a remissão completa da doença. Razões mais elevadas de PLR e NLR foram observadas nos pacientes com LH antes do tratamento quando comparados a remissão completa. Semelhantemente, a contagem absoluta de plaqueta também foi superior antes do tratamento. A LMR não apresentou diferença significativa (Figura 6).

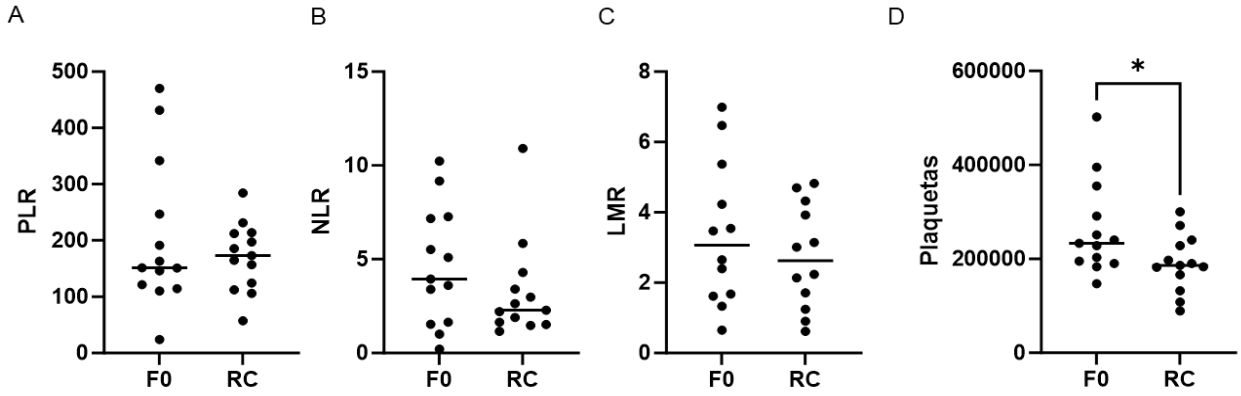


(A) Razão de plaquetas e linfócitos PLR. (B) Razão de neutrófilos e linfócitos NLR. (C) Razão de linfócitos e monócitos LMR. (D) Contagem total de plaquetas, obtidas antes e depois do tratamento (p<0,05; teste de Mann–Whitney). PLR: relação plaqueta e linfócito; NLR: relação neutrófilo e linfócito; LMR: relação linfócito e monócito.

Figura 6. Comparação dos parâmetros clínicos hematológicos entre pacientes com linfoma de Hodgkin antes e depois do tratamento

3.3.3 Parâmetros hematológicos antes e depois do tratamento no linfoma difuso de grandes células B

Os parâmetros de pacientes com LDGCB não apresentaram diferenças entre o momento antes do tratamento e após remissão completa. Entretanto, a contagem absoluta de plaqueta foi superior antes do tratamento quando comparado a remissão completa (Figura 7).



(A) Razão de plaquetas e linfócitos PLR. (B) Razão de neutrófilos e linfócitos NLR. (C) Razão de linfócitos e monócitos LMR. (D) Contagem total de plaquetas, obtidas antes e depois do tratamento (p<0,05; teste de Mann–Whitney). PLR: relação plaqueta e linfócito; NLR: relação neutrófilo e linfócito; LMR: relação linfócito e monócito.

Figura 7. Comparação dos parâmetros clínicos hematológicos entre pacientes com linfoma difuso de grandes células B antes e depois do tratamento

3.4 Comparação do perfil de expressão gênica de plaquetas de pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

Para avaliar se a expressão plaquetária é diferente em pacientes com LH e LDGCB, medimos os níveis de expressão de genes em RNA derivado de plaquetas. A comparação dos perfis de expressão de RNA derivado de plaquetas resultou em 36 genes significativamente diferentes ($p<0,05$). Desses 36 genes, 8 (DDAH1, PHGDH, LSMEM1, MUM1L1, RBM26, FPR3, MTRNR2L7 e DDXX27) foram mais expressos no grupo de plaquetas derivadas de pacientes com LDGCB e 28 mRNAs estavam mais expressos nas plaquetas derivadas de pacientes com LH (Tabela 3).

Tabela 3. Genes diferencialmente expressos entre plaquetas de pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

Gene	*Fold Change* (LH/LDGCB)	Valor-p
DDAH1	-2,85	0,0098
PHGDH	-1,85	0,0368
LSMEM1	-1,71	0,0315
MUM1L1	-1,68	0,0031
RBM26	-1,58	0,0433
FPR3	-1,53	0,0225
MTRNR2L7	-1,52	0,0285
DDX27	-1,52	0,0387
STARD3	1,5	0,0056
SLC37A1	1,5	0,019
DNAJC27	1,51	0,0055
PRRC2C	1,52	0,0331
CD99L2	1,52	0,0028
SYTL2	1,53	0,01
ZBED5	1,54	0,0423
FKBP3	1,54	0,0435
GOLGA8O	1,55	0,0184
BET1L	1,56	0,0465
DUSP19	1,58	0,0203
ROBO1	1,58	0,0446
HIST1H2BH	1,58	0,044
TAB3	1,59	0,017
VASH1	1,61	0,0054
C20orf194	1,65	0,0122
KCNA3	1,68	0,0215
SKIL	1,69	0,0196
LPIN1; MIR548S	1,73	0,0343
PTAFR	1,75	0,0369

continua...

...continuação

PPWD1	1,77	0,0123
TP53INP1	1,79	0,0111
C15orf57; MRPL42P5	1,79	0,0293
HIST1H2AK	2,06	0,0437
EVL	2,09	0,0156
CDR1; CDR1-AS	2,15	0,0485
HIST1H2BD	2,21	0,0093
CAMK2D	2,27	0,0416

LH: linfoma de Hodgkin; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B.

3.5 Perfil de microRNAs circulantes de pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

Neste estudo, investigamos e comparamos o perfil de expressão de miRNAs circulantes, no plasma de paciente com LH e LDGCB. Os resultados da tabela 4 mostram que 42 miRNAs foram diferencialmente expressos entre os tipos de linfoma. Metade dos miRNAs apresentou maior expressão no LH quando comparado ao LDGCB e a outra metade apresentou maior expressão no LDGCB em comparação ao LH.

Tabela 4. microRNAs circulantes diferencialmente expressos entre pacientes com linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

miRNA	**log2 (LH/LDGCB)**	**Valor-p**
hsa-let-7e-5p	4,51	0,0335
hsa-miR-379-5p	3,19	0,0076
hsa-miR-30c-5p	3,04	0,0276
hsa-miR-505-5p	2,6	0,0392
hsa-miR-494-3p	2,36	0,0061
hsa-mir-361	2,16	0,0172
hsa-miR-487b-3p	2,1	0,0108
hsa-miR-30b-5p	2,08	0,0259
hsa-miR-99b-5p	2,07	0,0273
hsa-miR-92b-3p	1,9	0,0443
hsa-miR-26b-5p	1,71	0,0123
hsa-miR-431-5p	1,31	0,0227
hsa-miR-30e-3p	1,26	0,0255
hsa-mir-92b	1,25	0,0082
hsa-miR-324-5p	1,11	0,0419
hsa-miR-155-5p	0,87	0,0263

continua...

...continuação

hsa-miR-98-5p	0,85	0,0262
hsa-miR-543	0,8	0,0321
hsa-miR-6742-5p	0,79	0,0365
hsa-miR-331-3p	0,63	0,0476
hsa-miR-1273h-3p	0,59	0,038
hsa-miR-6794-5p	-0,62	0,0107
hsa-miR-3960	-0,75	0,0135
hsa-miR-6089	-0,75	0,0275
hsa-miR-4508	-0,76	0,0449
hsa-miR-5001-5p	-0,77	0,0142
hsa-miR-7704	-0,79	0,0216
hsa-miR-1915-3p	-0,8	0,0485
hsa-miR-6791-5p	-0,8	0,0128
hsa-miR-2861	-0,83	0,019
hsa-miR-4787-5p	-0,84	0,0003
hsa-miR-6727-5p	-0,85	0,0295
hsa-miR-1273f	-0,87	0,0437
hsa-miR-1469	-0,9	0,0018
hsa-miR-6090	-0,91	0,0189
hsa-miR-8069	-0,94	0,0201
hsa-miR-3665	-1,01	0,0181
hsa-miR-6087	-1,1	0,0304
hsa-miR-4722-3p	-1,1	0,0285
hsa-miR-5787	-1,18	0,0032
hsa-miR-4516	-1,2	0,0086
hsa-miR-4532	-1,82	0,042

miRNA: microRNA; LH: linfoma de Hodgkin; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B

3.6 Comparação dos miRNAs circulantes diferencialmente expressos com dados da literatura

Com o objetivo de comparar o perfil de expressão dos c-miRNAs identificados no presente estudo com os padrões previamente descritos na literatura, foram selecionados 42 estudos, de acordo com os critérios estabelecidos na metodologia (Apêndice 1). Os estudos incluídos tiveram como principal objetivo a identificação de c-miRNAs com potencial aplicação como biomarcadores clínicos, especialmente para diagnóstico diferencial, estratificação prognóstica e monitoramento da resposta ao tratamento em LH e/ou LDGCB.

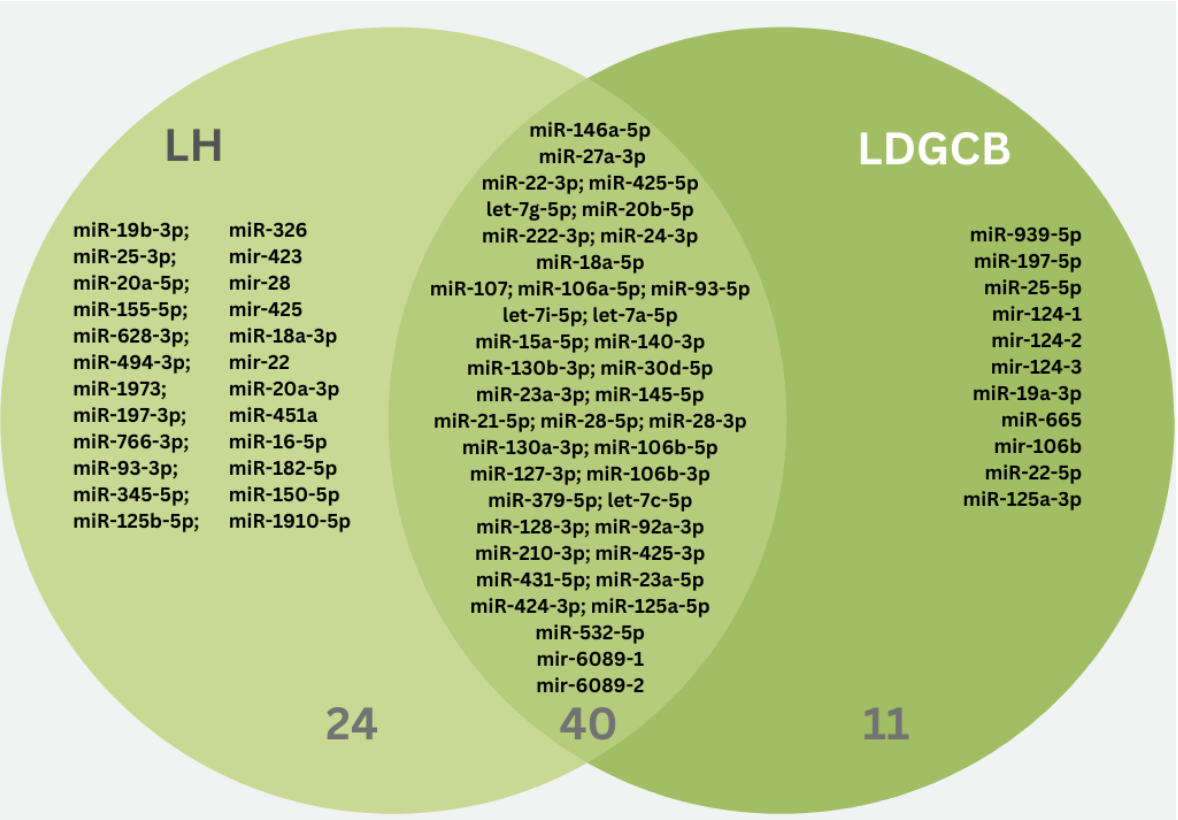
De modo geral, esses estudos apresentam considerável heterogeneidade em seus desenhos experimentais, incluindo variações nas técnicas

empregadas, no tipo de material biológico analisado, nas estratégias de comparação e no tamanho das coortes. Esses aspectos, assim como os miRNAs identificados em cada estudo, estão detalhados no apêndice 1.

Para a seleção dos miRNAs analisados, foram considerados aqueles previamente descritos como diferencialmente expressos nesses subtipos de linfoma. Nos casos em que a literatura não especificava o braço do miRNA (5p ou 3p), foi considerada a isoforma detectada em nosso conjunto de dados. Quando os miRNAs apresentavam múltiplos loci genômicos, foi considerado o produto maduro comum, de acordo com a nomenclatura estabelecida pelo miRBase. Para miRNAs pertencentes a *clusters* ou famílias com membros semelhantes, foram analisadas individualmente apenas as isoformas detectadas no presente estudo, respeitando-se suas distinções genômicas e funcionais.

Entre os mais de 100 c-miRNAs previamente descritos em linfomas na literatura, 75 apresentaram diferença significativa em uma ou mais das comparações realizadas neste estudo. Desses, 24 foram diferencialmente expressos exclusivamente nas comparações realizadas no LH, 11 exclusivamente no LDGCB e 42 apresentaram expressão diferencial em comparações envolvendo ambos os tipos tumorais (Figura 8).

A sobreposição observada reforça a existência de vias moleculares comuns na linfomagênese, enquanto os miRNAs exclusivos podem refletir particularidades biológicas e potenciais biomarcadores específicos de cada subtipo.



Observa-se que 24 miRNAs foram exclusivamente modulados no LH, 11 exclusivamente ao LDGCB e 40 miRNAs foram modulados em comparações dentro de ambos os subtipos. LH: linfoma de Hodgkin; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B.
Figura 8. Diagrama de Venn apresentando a distribuição dos c-miRNAs previamente descritos na literatura e que foram identificados como diferencialmente expressos no estudo

3.7 Análises do perfil de expressão de microRNAs circulantes no linfoma de Hodgkin

3.7.1 Comparação do perfil de expressão de microRNAs circulantes antes e depois do tratamento no linfoma de Hodgkin

Na avaliação do perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LH antes e depois do tratamento, identificamos 218 miRNAs diferencialmente expressos antes do tratamento em comparação aos pacientes em remissão completa, sendo 183 com expressão elevada antes do tratamento. Dentre estes, os miRNAs, miR-151a-5p, miR-146a-5p, miR-23b-3p, miR-15b-5p, miR-199a-3p, miR-199b-3p, miR-27a-3p, let-7e-5p, miR-22-3p e miR-425-5p, representam os dez miRNAs com maior expressão antes do tratamento (Tabela 5). A relação completa dos

miRNAs diferencialmente expressos entre os diferentes antes e depois do tratamento encontra-se no apêndice 2.

Tabela 5. Comparação do perfil de expressão de microRNAs no plasma de pacientes com linfoma de Hodgkin antes e depois do tratamento

miRNA	log_2FC (F0/RC)	Valor-p
hsa-miR-151a-5p	8,99	0,0016
hsa-miR-146a-5p	8,34	0,002
hsa-miR-23b-3p	7,9	0,0006
hsa-miR-15b-5p	7,88	0,0076
hsa-miR-199a-3p	7,73	0,0006
hsa-miR-199b-3p	7,73	0,0006
hsa-miR-27a-3p	7,71	0,0013
hsa-let-7e-5p	7,38	0,0017
hsa-miR-22-3p	7,33	0,003
hsa-miR-425-5p	7,29	0,0037

miRNA: microRNA.

3.7.1.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes previamente descritos em linfomas nos pacientes com linfoma de Hodgkin antes e depois do tratamento

Com o objetivo de comparar o perfil de expressão de c-miRNAs identificados neste estudo com aqueles previamente descritos na literatura, avaliamos exclusivamente os miRNAs já reportados em linfomas.

Entre os 218 miRNAs diferencialmente expressos na comparação entre o momento anterior ao tratamento e após remissão completa, identificamos 55 miRNAs diferencialmente expressos que foram previamente descritos na literatura. Dentre esses, 53 apresentaram expressão aumentada nos pacientes antes do tratamento, quando comparados a remissão completa da doença, enquanto apenas o miR-20a-3p apresentou maior expressão nos pacientes livres de doença (Tabela 6).

Tabela 6. microRNAs circulantes previamente descritos na literatura e diferencialmente expressos antes e depois do tratamento do linfoma de Hodgkin

miRNA	log_2FC (F0/RC)	Valor-p
hsa-miR-146a-5p	8,34	0,002
hsa-miR-27a-3p	7,71	0,0013
hsa-miR-22-3p	7,33	0,003
hsa-miR-425-5p	7,29	0,0037
hsa-let-7g-5p	7,25	0,0041
hsa-miR-20b-5p	7,21	0,0063

continua...

...continuação

hsa-miR-222-3p	6,9	0,0002
hsa-miR-24-3p	6,87	0,0022
hsa-miR-18a-5p	6,73	0,0029
hsa-miR-107	6,45	0,0019
hsa-miR-106a-5p	6,39	0,0057
hsa-miR-19b-3p	6,27	0,0223
hsa-miR-93-5p	6,16	0,0058
hsa-let-7i-5p	6,02	0,005
hsa-let-7a-5p	5,88	0,0036
hsa-miR-15a-5p	5,81	0,0166
hsa-miR-25-3p	5,78	0,0487
hsa-miR-140-3p	5,74	0,0346
hsa-miR-130b-3p	5,73	0,0064
hsa-miR-30d-5p	5,72	0,0058
hsa-miR-23a-3p	5,7	0,0063
hsa-miR-20a-5p	5,67	0,0092
hsa-miR-145-5p	5,63	0,0003
hsa-miR-21-5p	5,19	0,0021
hsa-miR-28-5p	5,12	0,0003
hsa-miR-28-3p	5,06	0,0002
hsa-miR-155-5p	4,86	0,0002
hsa-miR-130a-3p	4,84	0,0006
hsa-miR-106b-5p	4,57	0,007
hsa-miR-127-3p	4,36	0,001
hsa-miR-106b-3p	4,28	0,0127
hsa-miR-628-3p	3,87	0,007
hsa-miR-379-5p	3,75	0,0024
hsa-let-7c-5p	3,69	0,0414
hsa-miR-494-3p	3,64	0,0048
hsa-miR-128-3p	3,55	0,0092
hsa-miR-1973	3,39	0,0067
hsa-miR-197-3p	2,91	0,0007
hsa-miR-92a-3p	2,85	0,0377
hsa-miR-210-3p	2,85	0,0402
hsa-miR-425-3p	2,64	0,0006
hsa-miR-766-3p	2,52	0,0068
hsa-miR-93-3p	2,23	0,0262
hsa-miR-431-5p	2,15	0,0024
hsa-miR-345-5p	2,08	0,0392
hsa-miR-23a-5p	1,64	0,0139
hsa-miR-424-3p	1,19	0,0099
hsa-miR-125b-5p	1,15	0,0497
hsa-miR-326	1,03	0,0194
hsa-mir-423	0,73	0,0132
hsa-mir-28	0,7	0,0033
hsa-mir-425	0,64	0,0314
hsa-miR-18a-3p	0,62	0,0335
hsa-mir-22	0,62	0,0061
hsa-miR-20a-3p	-2,65	0,0239

miRNA: microRNA.

3.7.2 Os dez microRNAs mais expressos em pacientes com linfoma de Hodgkin com estadiamento avançado

Para avaliar possíveis diferenças na expressão de c-miRNAs em diferentes estágios clínicos da doença ao diagnóstico, estratificamos os pacientes em dois grupos, de acordo com o estadiamento clínico: estágios iniciais (I e II) e estágios avançados (III e IV).

Foram identificados 290 miRNAs diferencialmente expressos, sendo 281 miRNAs com expressão elevada no plasma de pacientes classificados, ao diagnóstico, nos estágios avançados (III e IV) e 9 com expressão elevada no plasma de pacientes classificados nos estágios iniciais (I e II). Dentre estes, os miRNAs miR-103a-3p, miR-191-5, miR-17-5p, miR-23a-3p, let-7d-5p, miR-107, miR-106a-5p, miR-20a-5p, miR-126-3p e let-7i-5p, representam os dez miRNAs com maior expressão nos estágios avançados (Tabela 7). A relação completa dos miRNAs diferencialmente expressos entre os diferentes estágios clínicos no LH encontra-se no apêndice 3.

Tabela 7. Os dez microRNAs diferencialmente mais expressos em pacientes com linfoma de Hodgkin classificado em estágios avançados, comparados àqueles em estágio inicial

miRNA	log_2FC (III-IV/I-II)	Valor-p
hsa-miR-103a-3p	10,41	0,002
hsa-miR-191-5p	10,14	0,0038
hsa-miR-17-5p	10,02	0,0038
hsa-miR-23a-3p	9,78	0,0213
hsa-let-7d-5p	9,76	0,0042
hsa-miR-107	9,71	0,0024
hsa-miR-106a-5p	9,68	0,0038
hsa-miR-20a-5p	9,51	0,0037
hsa-miR-126-3p	9,31	0,0037
hsa-let-7i-5p	8,95	0,0035

miRNA: microRNA.

3.7.2.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes previamente descritos em linfomas e sua associação com o estadiamento clínico no linfoma de Hodgkin

Para esta análise, aplicamos os mesmos critérios de seleção de miRNAs previamente descritos anteriormente.

Identificamos 47 miRNAs diferencialmente expressos, todos eles com expressão elevada em pacientes classificados, ao diagnóstico, nos estágios avançados (III e IV) quando comparados aos pacientes classificados em estágios iniciais (Tabela 8).

Tabela 8. microRNAs circulantes previamente descritos na literatura e diferencialmente expressos no linfoma de Hodgkin classificado em estágio avançado

miRNA	log_2FC (III-IV/I-II)	Valor-p
hsa-miR-23a-3p	9,78	0,0213
hsa-miR-107	9,71	0,0024
hsa-miR-20a-5p	9,51	0,0037
hsa-let-7i-5p	8,95	0,0035
hsa-miR-93-5p	8,86	0,0015
hsa-miR-146a-5p	8,63	0,0026
hsa-miR-27a-3p	8,08	0,0047
hsa-miR-425-5p	7,99	0,0022
hsa-miR-22-3p	7,86	0,0044
hsa-miR-20b-5p	7,72	0,005
hsa-miR-222-3p	7,49	0,0032
hsa-let-7g-5p	7,34	0,0071
hsa-miR-25-3p	7,34	0,0081
hsa-miR-19b-3p	7,24	0,0056
hsa-miR-18a-5p	7,22	0,0071
hsa-miR-451a	6,47	0,0199
hsa-let-7a-5p	6,27	0,0298
hsa-miR-140-3p	6,27	0,0072
hsa-miR-30d-5p	6,23	0,0032
hsa-miR-125a-5p	5,92	0,0109
hsa-miR-15a-5p	5,91	0,0075
hsa-miR-21-5p	5,78	0,0051
hsa-miR-145-5p	5,77	0,0062
hsa-miR-130a-3p	5,18	0,0056
hsa-miR-28-3p	5,17	0,002
hsa-miR-628-3p	4,08	0,0053
hsa-miR-127-3p	4,06	0,0088
hsa-miR-379-5p	4,05	0,0057
hsa-miR-16-5p	4	0,0124
hsa-miR-24-3p	3,81	0,0013
hsa-miR-425-3p	3,75	0,0057
hsa-miR-494-3p	3,66	0,0144
hsa-miR-182-5p	3,57	0,0302
hsa-miR-150-5p	3,47	0,0316
hsa-miR-532-5p	3,39	0,0369
hsa-miR-197-3p	3,24	0,0068
hsa-mir-6089-1	3,22	0,0141
hsa-mir-6089-2	3,22	0,0141
hsa-miR-128-3p	3,17	0,0259
hsa-miR-210-3p	3,03	0,0476

continua...

...continuação

hsa-miR-155-5p	2,76	0,0197
hsa-miR-345-5p	2,39	0,0348
hsa-miR-93-3p	2,16	0,0479
hsa-miR-766-3p	2,14	0,0159
hsa-miR-431-5p	1,91	0,0161
hsa-miR-1973	1,51	0,0396
hsa-miR-1910-5p	0,74	0,0117

miRNA: microRNA.

3.8 Análises do perfil de expressão de microRNAs circulantes no linfoma difuso de grandes células B

3.8.1 Comparação do perfil de expressão de miRNAs circulantes antes e depois do tratamento no linfoma difuso de grandes células B

Ao comparar o perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LDGCB antes do tratamento e após remissão completa, observou-se maior expressão de miR-6776-5p antes do tratamento, enquanto miR-140-3p, miR-423-5p, miR-6797-5p e miR-6865-5p apresentaram expressão reduzida no mesmo momento (Tabela 9). Apenas o miR-140-3p foi previamente descrito com expressão alterada em linfomas.

Tabela 9. Comparação do perfil de expressão de microRNAs no plasma de pacientes com linfoma difuso de grandes células B antes e depois do tratamento

miRNA	**log_2FC (F0/RC)**	**Valor-p**
hsa-miR-140-3p	-1,89	0,0432
hsa-miR-423-5p	-3,37	0,0174
hsa-miR-6797-5p	-0,62	0,049
hsa-miR-6865-5p	-0,61	0,0451
hsa-miR-6776-5p	1,14	0,0427

miRNA: microRNA.

3.8.2 Os dez microRNAs mais expressos em pacientes com linfoma difuso de grandes células B com estadiamento avançado

Para identificar c-miRNAs potencialmente associados à progressão do LDGCB, avaliamos o perfil de expressão no plasma de pacientes em diferentes

estágios clínicos. Foram identificados 203 miRNAs diferencialmente expressos, sendo 179 mais expressos no plasma de pacientes classificados, ao diagnóstico, nos estágios avançados (III e IV). Dentre estes, os miRNAs miR-107, let-7a-5p, miR-103a-3p, miR-221-3p, miR-126-3p, miR-23b-3p, miR-22-3p, miR-26a-5p, miR-744-5p e miR-93-5p representam os dez com maior expressão nesses pacientes (Tabela 10). A lista completa dos miRNAs diferencialmente expressos entre os diferentes estágios clínicos está disponível no apêndice 4.

Tabela 10. Os dez microRNAs mais diferencialmente expressos em pacientes com linfoma difuso de grandes células B classificado em estágio avançado, comparados àqueles em estágio inicial

miRNA	log_2FC (III-IV/I-II)	Valor-p
hsa-miR-107	8,45	0,011
hsa-let-7a-5p	8,14	0,0214
hsa-miR-103a-3p	7,93	0,008
hsa-miR-221-3p	7,76	0,0067
hsa-miR-126-3p	7,6	0,0153
hsa-miR-23b-3p	7,21	0,006
hsa-miR-22-3p	6,85	0,0203
hsa-miR-26a-5p	6,65	0,0331
hsa-miR-744-5p	6,65	0,0207
hsa-miR-93-5p	6,56	0,0123

miRNA: microRNA.

3.8.2.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes previamente descritos em linfomas e sua associação com o estadiamento clínico no linfoma difuso de grandes células B

Para esta análise, aplicamos os mesmos critérios de seleção de miRNAs previamente descritos anteriormente.

Após análise de pacientes com LDCGB, identificamos 44 miRNAs diferencialmente expressos, a maioria com expressão elevada em pacientes classificados, ao diagnóstico, nos estágios avançados quando comparados aos pacientes em estágios mais iniciais. Apenas o miR-124 apresentou menor expressão em pacientes com estágios mais avançados (Tabela 11).

Tabela 11. microRNAs circulantes previamente descritos na literatura e diferencialmente expressos no linfoma difuso de grandes células B classificado em estágio avançado

miRNA	log_2FC (III-IV/I-II)	Valor-p
hsa-miR-107	8,45	0,011
hsa-let-7a-5p	8,14	0,0214
hsa-miR-22-3p	6,85	0,0203
hsa-miR-93-5p	6,56	0,0123
hsa-miR-106a-5p	6,5	0,021
hsa-miR-425-5p	6,3	0,0268
hsa-miR-106b-5p	6,24	0,0181
hsa-let-7c-5p	6,2	0,0045
hsa-miR-23a-3p	6,16	0,0249
hsa-miR-92a-3p	5,93	0,0132
hsa-miR-130b-3p	5,73	0,0271
hsa-miR-222-3p	5,52	0,0244
hsa-miR-20b-5p	5,4	0,0065
hsa-miR-18a-5p	5,31	0,0071
hsa-miR-27a-3p	4,96	0,0055
hsa-let-7g-5p	4,9	0,0031
hsa-miR-24-3p	4,79	0,0069
hsa-let-7i-5p	4,77	0,0294
hsa-miR-140-3p	4,51	0,0104
hsa-miR-146a-5p	4,42	0,0438
hsa-miR-30d-5p	4,38	0,0106
hsa-miR-15a-5p	3,95	0,0135
hsa-miR-145-5p	3,46	0,0129
hsa-miR-28-3p	3,41	0,0188
hsa-miR-106b-3p	3,31	0,0294
hsa-miR-130a-3p	3,26	0,0216
hsa-miR-23a-5p	3,18	0,014
hsa-miR-21-5p	2,99	0,0269
hsa-miR-28-5p	2,99	0,0197
hsa-mir-6089-1	2,76	0,0487
hsa-mir-6089-2	2,76	0,0487
hsa-miR-425-3p	2,59	0,0173
hsa-miR-125a-5p	2,49	0,0456
hsa-miR-210-3p	2,29	0,0188
hsa-miR-532-5p	2,09	0,0465
hsa-miR-127-3p	2,07	0,0329
hsa-miR-939-5p	1,18	0,0228
hsa-miR-128-3p	1,17	0,0372
hsa-miR-197-5p	1,05	0,0393
hsa-miR-424-3p	0,8	0,0401
hsa-miR-25-5p	0,62	0,0237
hsa-mir-124-1	-0,62	0,0037
hsa-mir-124-2	-0,62	0,0037
hsa-mir-124-3	-0,62	0,0037

miRNA: microRNA.

3.8.3 Os 10 microRNAs mais expressos em pacientes com desfecho desfavorável no linfoma difuso de grandes células B

Com o objetivo de identificar miRNAs com potencial prognóstico, avaliamos a o perfil de expressão de c-miRNAs em pacientes com desfecho desfavorável em comparação àqueles em remissão completa. Para isso, os pacientes foram estratificados em dois grupos de desfecho clínico: remissão completa (RC) e óbito.

Foram identificados 72 miRNAs com expressão significativamente distinta no plasma de pacientes com LDGCB com desfecho desfavorável em relação aos pacientes com remissão completa. Dentre estes, os miRNAs miR-15a-5p, miR-339-3p, miR-532-5p, miR-629-5p, miR-148b-3p, miR-432-5p, miR-409-3p, -miR-425-3p, miR-210-3p, miR-148a-3p, representam os dez miRNAs com maior expressão nesses pacientes (Tabela 12). Apenas os miRNAs miR-4508 e miR-6791-5p apresentaram menor expressão nos pacientes com desfecho desfavorável comparados àqueles em remissão. A relação completa dos miRNAs diferencialmente expressos entre os diferentes desfechos encontra-se no apêndice 4.

Tabela 12. Os dez microRNAs com maior expressão em pacientes com desfecho desfavorável no linfoma difuso de grandes células B

miRNA	log_2FC (óbito/RC)	Valor-p
hsa-miR-15a-5p	4,93	0,035
hsa-miR-339-3p	4,43	0,0481
hsa-miR-532-5p	4,29	0,016
hsa-miR-629-5p	4,01	0,0407
hsa-miR-148b-3p	3,94	0,0335
hsa-miR-432-5p	3,79	0,0209
hsa-miR-409-3p	3,74	0,0301
hsa-miR-425-3p	3,53	0,0188
hsa-miR-210-3p	3,43	0,0252
hsa-miR-148a-3p	3,15	0,0179

miRNA: microRNA.

3.8.3.1 Perfil de expressão de microRNAs circulantes previamente descritos em linfomas e sua associação com o desfecho clínico no linfoma difuso de grandes células B

Para a seleção dos miRNAs utilizamos os mesmos critérios dos conjuntos de dados comparativos anteriores.

Foram identificamos 13 miRNAs diferencialmente expressos, previamente descritos, todos eles com expressão elevada no plasma de pacientes com desfecho desfavorável quando comparados àqueles em remissão completa (Tabela 13).

Tabela 13. microRNAs circulantes previamente descritos na literatura e diferencialmente expressos no linfoma difuso de grandes células B com desfecho desfavorável

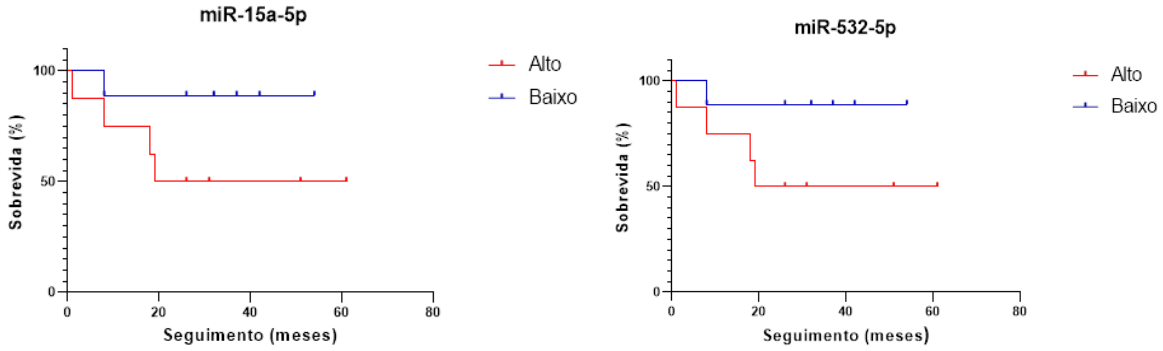
miRNA	log_2FC (óbito/RC)	Valor-p
hsa-miR-15a-5p	4,93	0,035
hsa-miR-532-5p	4,29	0,016
hsa-miR-425-3p	3,53	0,0188
hsa-miR-210-3p	3,43	0,0252
hsa-miR-127-3p	3,08	0,0072
hsa-miR-379-5p	1,74	0,0085
hsa-miR-19a-3p	1,57	0,0285
hsa-miR-665	1,36	0,0402
hsa-miR-431-5p	1,18	0,0067
hsa-mir-106b	0,91	0,0356
hsa-miR-25-5p	0,78	0,0289
hsa-miR-22-5p	0,76	0,0388
hsa-miR-125a-3p	0,69	0,0135

miRNA: microRNA.

3.8.3.2 Sobrevida global estratificada pela expressão de miR-15 e miR-532 em pacientes com linfoma difuso de grandes células B

Para avaliar o potencial prognóstico dos miRNAs mais expressos em pacientes com desfecho desfavorável, selecionamos aqueles cuja expressão apresenta concordância com estudos prévios. Embora a diferença não tenha alcançado significância estatística, a elevada expressão de miR-15a-5p e miR-532-5p apresentou uma tendência de associação a pior prognóstico (Figura 9). Esse achado sugere que esses miRNAs podem estar envolvidos em mecanismos moleculares relacionados à

progressão do LDGCB, e indica que estudos futuros com coortes maiores poderiam validar seu papel como potenciais biomarcadores prognósticos.



As curvas de Kaplan–Meier demonstram a comparação entre pacientes com alta e baixa expressão de miR-15a-5p (A) e miR-532-5p (B).
Figura 9. Curvas de sobrevida global estratificadas pela expressão de miR-15a-5p e miR-532-5p em pacientes com linfoma difuso de grandes células B

3.9 Análise funcional dos microRNAs diferencialmente expressos

3.9.1 Identificação de genes-alvo e enriquecimento de vias de sinalização potencialmente reguladas pelo miRNAs diferencialmente expressos entre linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

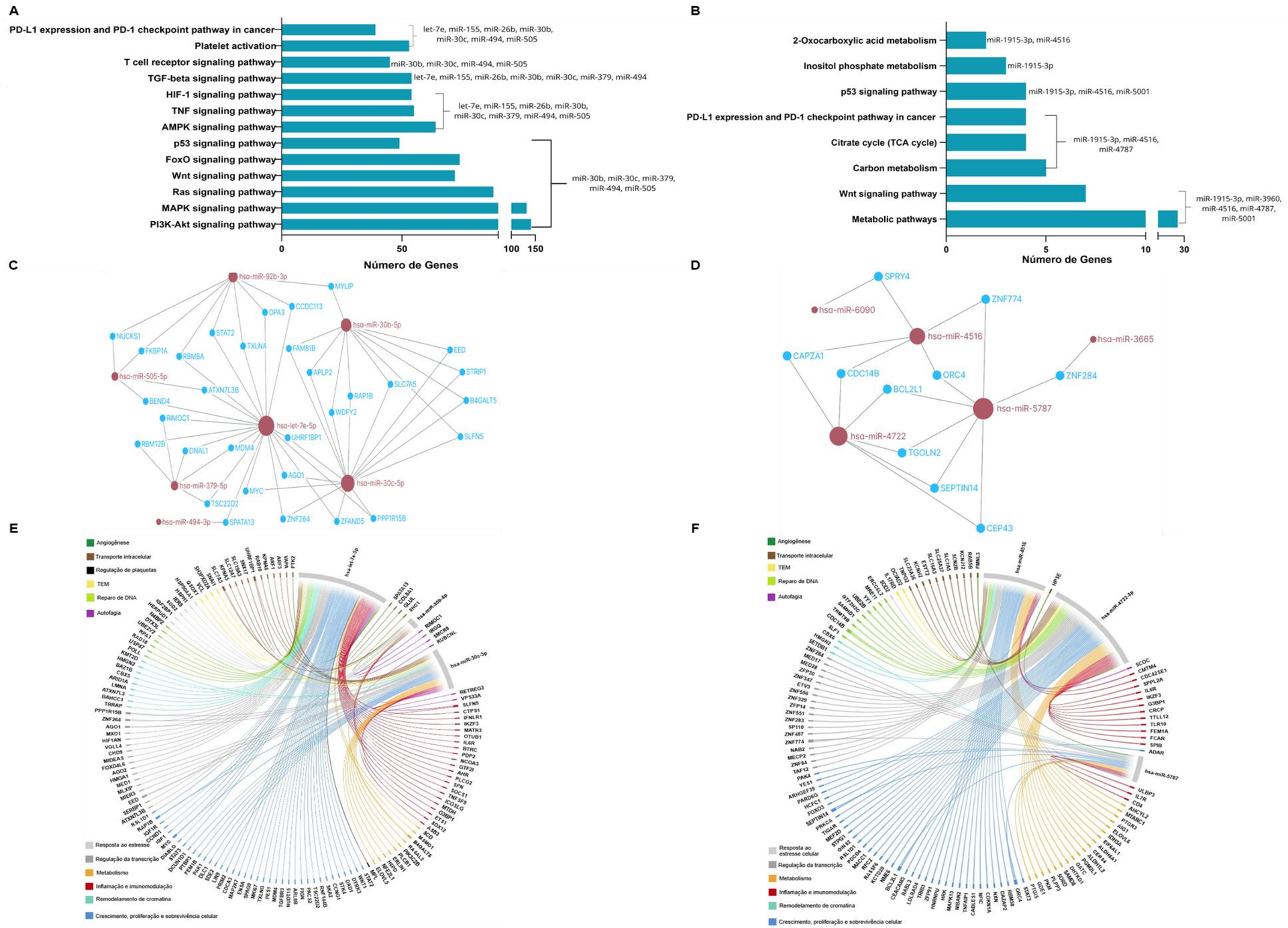
A análise de enriquecimento mostrou um envolvimento dos miRNAs mais expressos no LH nas principais vias classicamente desreguladas na carcinogênese, tais como as vias da MAPK, FoxO, AMPK, HIF-1, p53, TGF-β, Ras, PI3K-Akt. Além disso, observou-se enriquecimento em vias inflamatórias, como a via do TNF, PD-L1, sinalização de TCR e ativação de plaquetas, sugerindo um possível papel desses miRNAs na modulação de processos inflamatórios e de sobrevivência celular. Os miRNAs mais expressos no LDGCB enriquecem vias relacionadas ao metabolismo e carcinogênese, uma via integrativa que reúne interações previamente descritas entre miRNAs e genes envolvidos em processos tumorais (Figura 10A e 10B). Em conjunto, esses achados sugerem que, embora ambas as doenças compartilhem o envolvimento de vias centrais da carcinogênese, os miRNAs diferencialmente expressos no LH parecem estar associados também à modulação de vias inflamatórias e de sinalização imune, enquanto no LDGCB observa-se um predomínio de vias relacionadas ao

metabolismo celular. Essas diferenças reforçam a existência de perfis moleculares distintos entre os dois subtipos de linfoma, refletindo mecanismos biológicos específicos que podem impactar o comportamento tumoral, a progressão da doença e potenciais estratégias terapêuticas.

Posteriormente, foram construídas redes de interação miRNA–gene alvo de forma independente para cada subtipo de linfoma. Observamos interação entre sete dos miRNAs mais expressos no LH (Figura 10C). No LDGCB, houve interação entre cinco miRNAs (Figura 10D). Diferentemente da análise de enriquecimento, que teve como objetivo identificar vias diferencialmente reguladas entre as doenças, esta abordagem buscou explorar a organização das interações entre miRNAs e seus genes-alvo dentro de cada contexto biológico específico. Essa análise permite identificar possíveis padrões de conectividade que refletem o papel dos miRNAs na modulação de redes gênicas em cada subtipo, evidenciando miRNAs que podem contribuir para a manutenção de processos ou comportamento tumoral de cada linfoma.

Adicionalmente, os principais genes-alvo dos três miRNAs com maior número de interações foram identificados e classificados de acordo com seu envolvimento em processos biológicos relevantes.

No LH, observa-se uma marcada presença de genes associados a crescimento, proliferação e sobrevivência celular, inflamação e imunomodulação, além de genes envolvidos na regulação da transcrição (Figura 10E). No LDGCB, os genes-alvo estão predominantemente relacionados a crescimento, proliferação e sobrevivência, metabolismo, inflamação e imunomodulação, reparo de DNA e regulação da transcrição (Figura 10F).



A análise de enriquecimento foi conduzida na plataforma DIANA-miRPath v4.0, considerando os genes-alvo validados dos miRNAs com maior expressão significativa no (A) LH e (B) LDGCB. Foram selecionadas as vias do (KEGG) com valor-p<0,05. O gráfico de barras representa o número de genes-alvo em cada via e o número de miRNAs envolvidos está indicado na frente das barras. As redes foram criadas através do *Graph Commons* e as redes indicam as associações entre os genes-alvo validados dos miRNAs mais expressos no LH (C) e LDGCB (D). Os círculos vermelhos representam os miRNAs, enquanto os círculos azuis representam os genes-alvo. Os genes-alvos validados dos três miRNAs mais representativos em cada rede no LH (E) e no LDGCB (F), distribuídos de acordo com os processos biológicos que estão envolvidos, conforme indicado pelas cores na legenda. Os genes-alvo foram obtidos a partir da base de dados miRWalk. LH: linfoma de Hodgkin; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; miRNA: microRNA.

Figura 10. Enriquecimento de vias KEGG e redes de interação miRNA–gene no linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

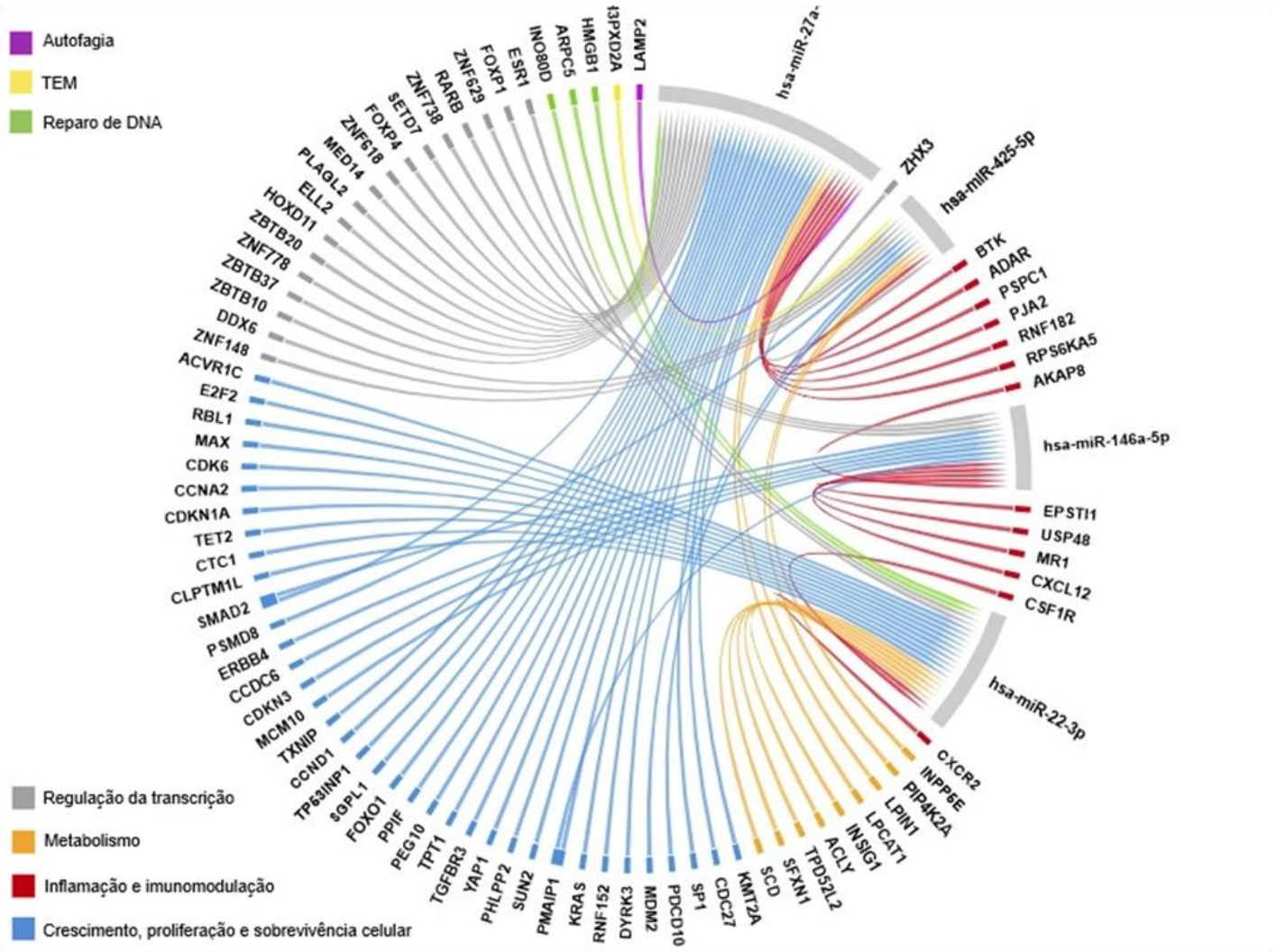
3.9.2 Identificação de genes-alvo e enriquecimento de vias de sinalização potencialmente reguladas pelo microRNAs no linfoma de Hodgkin

Para explorar o enriquecimento de vias possivelmente reguladas pelos miRNAs diferencialmente expressos no LH, foram selecionados, dentre os dez miRNAs com maiores valores de log_2FC, aqueles previamente descritos na literatura.

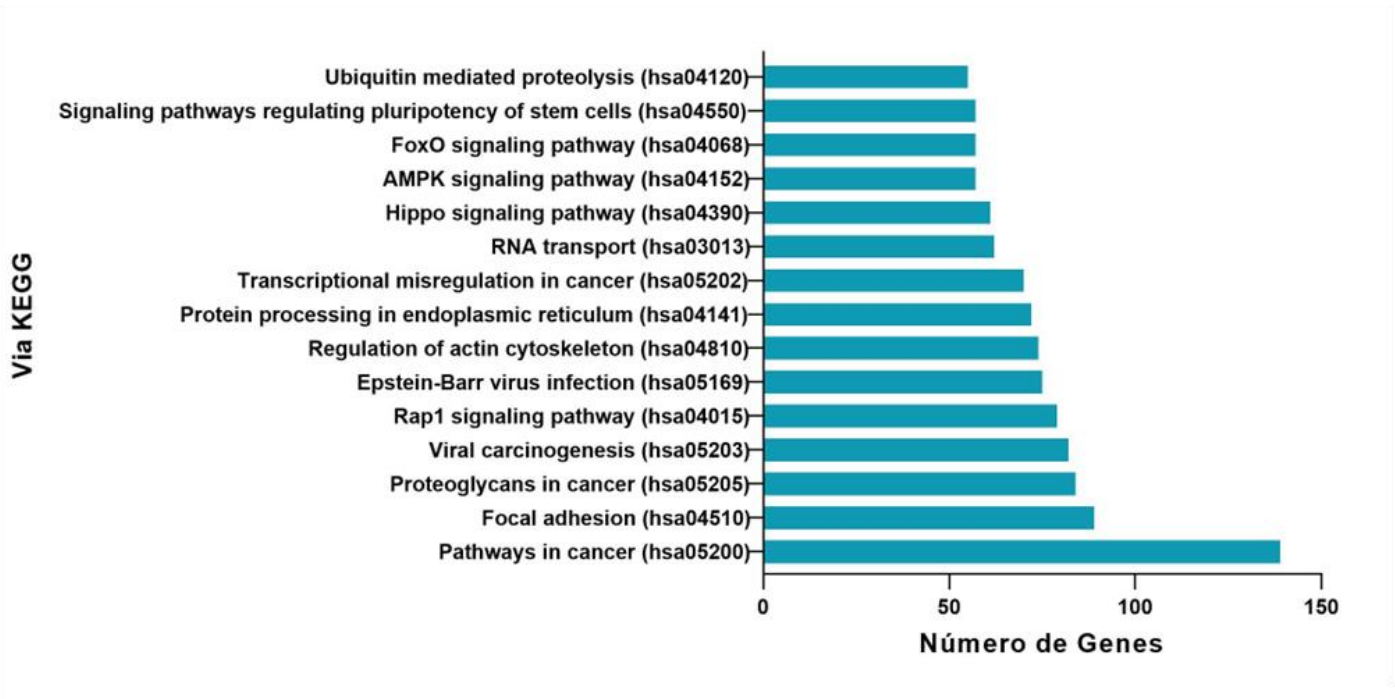
A figura 11A apresenta os genes-alvo dos miRNAs selecionados (miR-146a-5p, miR-27a-3p, miR-22-3p e miR-425-5p), que exibiram maior expressão nos pacientes com LH antes do tratamento em comparação à remissão completa. O enriquecimento de vias associado a esses miRNAs está ilustrado na figura 11B. As vias mais representativas incluem processos clássicos relacionados ao câncer, como as vias de sinalização FoxO, Hippo e AMPK, evidenciando o potencial papel desses miRNAs na carcinogênese do LH.

De forma complementar, a figura 11C apresenta o enriquecimento de vias dos miRNAs mais expressos em pacientes com estágios mais avançados do LH (miR-23a, miR-20a, miR-107 e let-7i). Observa-se o envolvimento em vias associadas à tumorigênese, incluindo PI3K-Akt e ciclo celular. Esses achados reforçam a possível contribuição desses miRNAs na progressão tumoral.

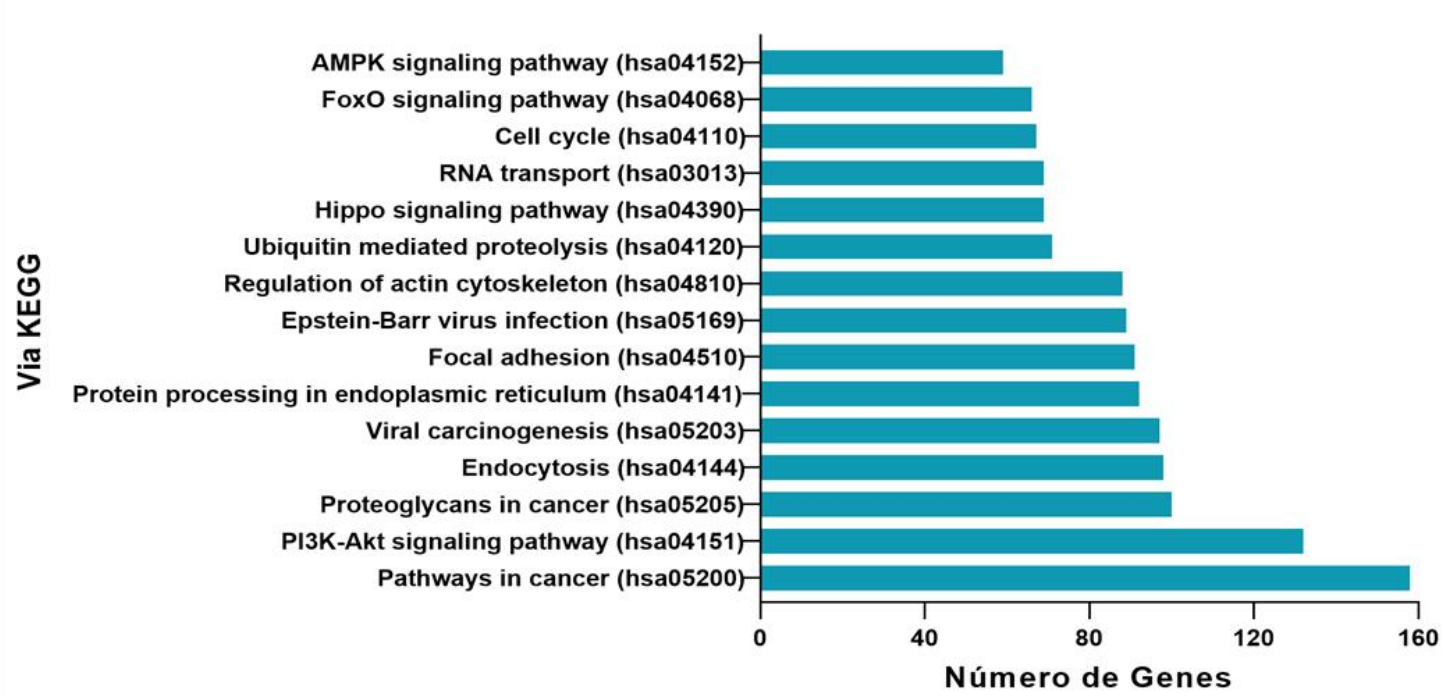
A



B



C



Os genes-alvo foram obtidos a partir da base de dados miRWalk e foram distribuídos de acordo com os processos biológicos que estão envolvidos, conforme indicado pelas cores na legenda (A). A análise de enriquecimento foi conduzida na plataforma DIANA-miRPath v4.0, considerando os genes-alvo validados dos miRNAs diferencialmente expressos antes e após o tratamento (B), bem como entre diferentes estágios clínicos (C). Foram selecionadas as vias KEGG com valor-p <0,05. KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*.

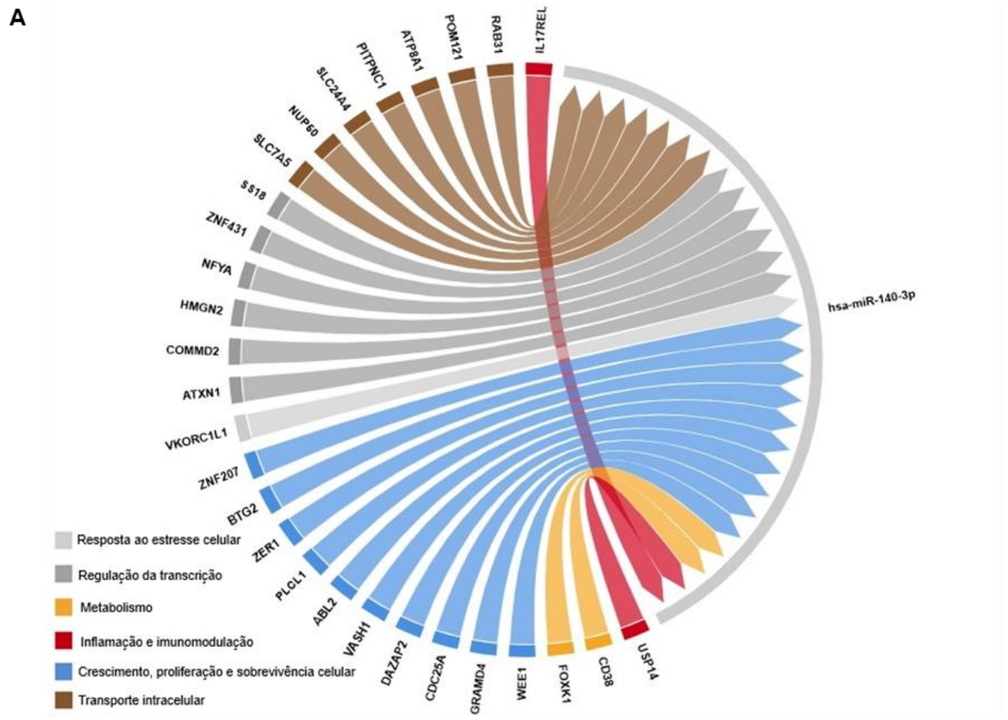
Figura 11. Genes-alvo validados e vias KEGG enriquecidas pelos miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes com linfoma de Hodgkin

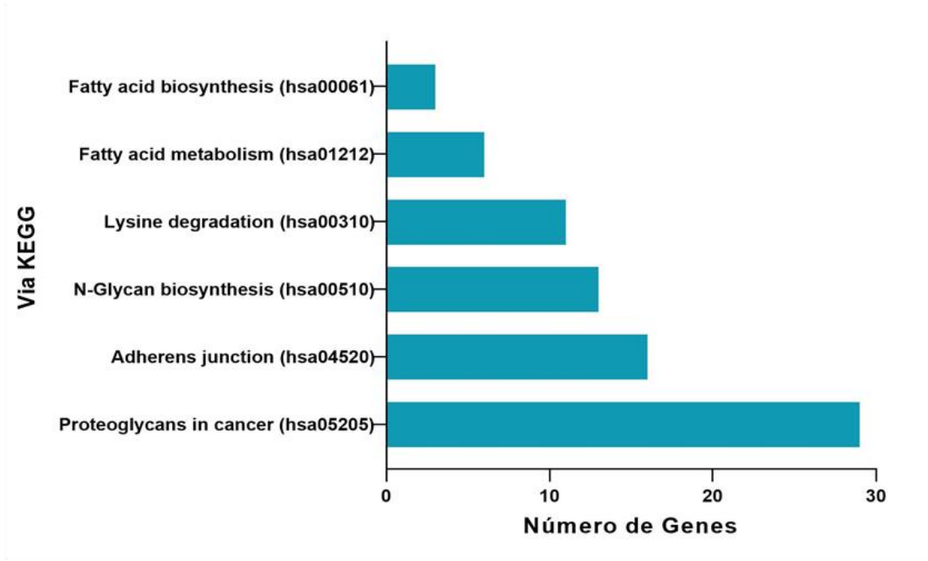
3.9.3 Identificação de genes-alvo e enriquecimento de vias de sinalização potencialmente reguladas pelo microRNAs no linfoma difuso de grandes células B

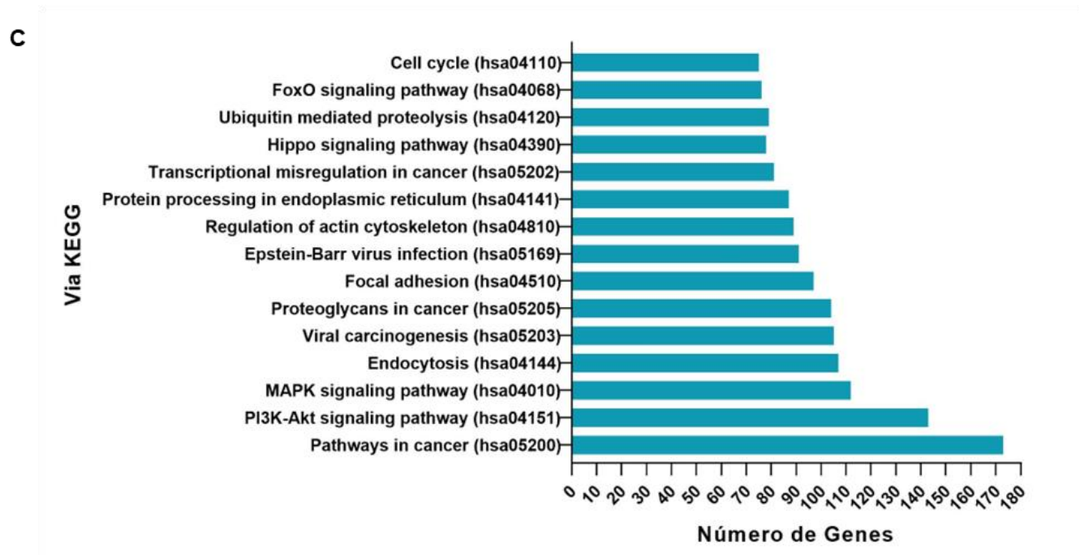
Para explorar vias potencialmente associadas ao LDGCB, foram identificados os genes-alvo do miR-140-3p, seguidos da análise de enriquecimento de vias envolvendo esse miRNA e seus genes-alvo, conforme ilustrado nas figuras 12A e 12B. Observa-se o envolvimento de vias relacionadas ao metabolismo e a proteoglicanos, os quais desempenham papel central na progressão tumoral, metástase, angiogênese e evasão imunológica.

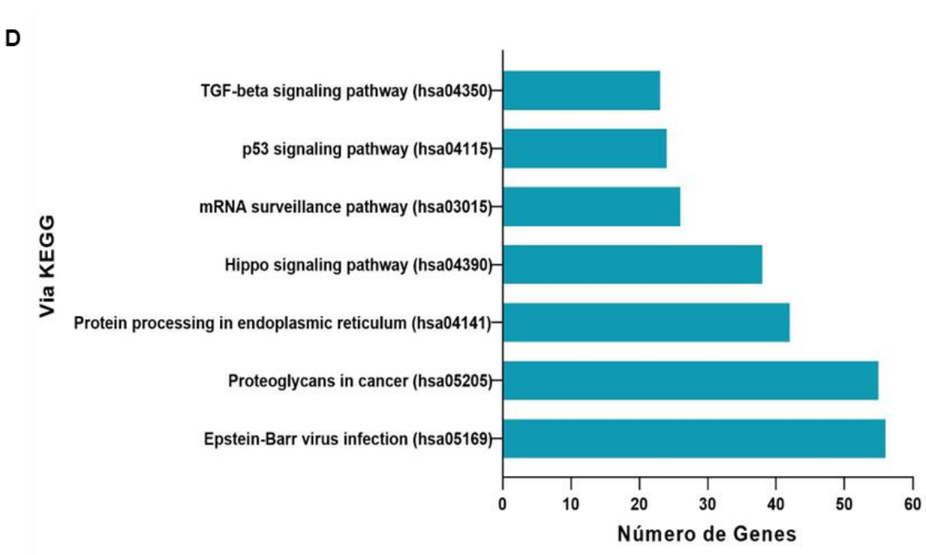
Dentre os dez miRNAs mais expressos em pacientes com estágios avançados, foram selecionados aqueles previamente descritos na literatura (miR-107, let-7a-5p, miR-22-3p e miR-93-5p) para análise de enriquecimento funcional. A figura 12C ilustra as principais vias potencialmente reguladas por esses miRNAs e seus genes-alvo validados, destacando-se vias relacionadas ao ciclo celular, sinalização FoxO, PI3K-Akt e MAPK, sugerindo o envolvimento desses miRNAs em processos de proliferação celular e progressão tumoral no LDGCB.

De forma complementar, foram selecionados os miRNAs com maior expressão em pacientes com desfecho clínico desfavorável previamente descritos na literatura (miR-15a, miR-532 e miR-425). O enriquecimento de vias associado a esses miRNAs está apresentado na figura 12D. Entre as principais vias identificadas, destacam-se as vias de sinalização p53 e TGF-β, além de vias relacionadas à sobrevivência celular e proteoglicanos. Esses achados sugerem a participação desses miRNAs em processos como evasão da morte celular, transição epitélio-mesenquimal, metástase e evasão imune, todos associados à maior agressividade tumoral e ao pior prognóstico.









Os genes-alvo foram obtidos a partir da base de dados miRWalk e foram distribuídos de acordo com os processos biológico que estão envolvidos, conforme indicado pelas cores na legenda (A). A análise de enriquecimento foi conduzida na plataforma DIANA-miRPath v4.0, considerando os genes-alvo validados dos miRNAs diferencialmente expressos antes e após o tratamento (B), bem como entre diferentes estágios clínicos (C) e desfechos clínicos (D). Foram selecionadas as vias KEGG com valor-p <0,05. miRNA: microRNA.

Figura 12. Genes-alvo validados e vias KEGG enriquecidas pelos miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes com linfoma difuso de grandes células B

4 DISCUSSÃO

O padrão-ouro para o diagnóstico de linfomas permanece sendo a análise histológica, embora o detalhamento molecular seja essencial para caracterização precisa das neoplasias hematológicas.[6] Entretanto, a caracterização molecular tradicionalmente obtida por biópsia tecidual, enfrenta limitações devido ao caráter invasivo do procedimento e à dificuldade em refletir a heterogeneidade intratumoral. Nesse contexto, a biópsia líquida tem emergido como uma ferramenta promissora, permitindo, a partir de uma coleta de sangue, detectar e caracterizar tumores, superar restrições da biópsia convencional e monitorar em tempo real a evolução da doença. Os biomarcadores derivados dessa abordagem podem auxiliar na detecção precoce, estratificação de risco, monitoramento da resposta terapêutica, identificação de alvos e mecanismos de resistência, além de ampliar a compreensão da biologia metastática.[35]

Nesse cenário, o presente estudo investigou os perfis de mRNAs plaquetários e c-miRNAs em pacientes com LH e LDGCB, com o objetivo de explorar o seu potencial como biomarcadores minimamente invasivos para refletir as alterações moleculares associadas à fisiopatologia da doença, ao prognóstico à resposta ao tratamento. Considerando o número amostral reduzido, a discussão concentra-se na interpretação integrativa dos resultados, enfatizando as comparações com dados previamente descritos na literatura e o significado biológico das alterações observadas.

A análise do perfil clínico-demográfico dos pacientes demonstrou características consistentes com o padrão epidemiológico descrito para esses linfomas. Observou-se uma mediana de idade de 36 anos para o grupo com LH e de 66 anos para o linfoma difuso LDGCB, em concordância com a distribuição etária descrita na literatura, na qual o LH acomete predominantemente adultos jovens e o LDGCB ocorre com maior frequência em indivíduos após a sexta década de vida.[2,3] A proporção entre os sexos foi equilibrada em ambos os grupos, sem diferenças significativas.

Em relação ao estadiamento clínico, a maioria dos pacientes, nas duas doenças, apresentou doença em estágios avançados (III–IV), com maior prevalência de sintomas B no LH (61,5%) em comparação ao LDGCB (43,5%). No LDGCB, a estratificação prognóstica baseada no IPI concentrou-se nas categorias intermediária e alta, enquanto no LH predominaram casos de baixo risco conforme o IPS. Esses achados refletem o comportamento clínico mais agressivo do LDGCB e reforçam

a necessidade de ferramentas moleculares capazes de auxiliar na estratificação prognóstica e no monitoramento terapêutico desses pacientes.

Além da caracterização clínica, foram avaliados parâmetros hematológicos associados à resposta inflamatória sistêmica, incluindo as razões neutrófilo-linfócito, plaqueta-linfócito e linfócito-monócito, frequentemente descritas como marcadores prognósticos em neoplasias hematológicas.[62,66-68] Observou-se aumento das razões neutrófilo-linfócito e plaqueta-linfócito nos pacientes com LH, sugerindo maior atividade inflamatória sistêmica nesse grupo, assim como observado na proporção de pacientes com sintomas B nessa coorte. Alterações nesses parâmetros têm sido associadas à modulação do microambiente tumoral e à resposta imunológica, refletindo a interação dinâmica entre o tumor e o sistema imune.[62-68]

Nos últimos anos, tem se consolidado o conceito de plaquetas educadas pelo tumor, no qual células tumorais são capazes de modular a produção, ativação e o perfil transcricional das plaquetas circulantes. Esse processo resulta em alterações no transcriptoma plaquetário que refletem o estado biológico do tumor e podem contribuir para a progressão tumoral, angiogênese e evasão imunológica.[69,76] Embora a trombocitose seja amplamente relatada em tumores sólidos, dados referentes a malignidades hematológicas são mais escassos.[61] Em nossa coorte, a contagem plaquetária encontrava-se elevada antes do tratamento tanto no LH quanto no LDGCB, sugerindo que mecanismos de ativação megacariocítica e de reprogramação plaquetária também podem estar presentes nesses linfomas.[61]

A análise do transcriptoma plaquetário fornece uma oportunidade única para compreender como o eixo de comunicação linfoma–plaqueta se manifesta em nível molecular. No presente estudo, foi possível identificar assinaturas específicas de expressão gênica em plaquetas de pacientes com LH e LDGCB, evidenciando pela primeira vez a modulação do transcriptoma plaquetário em linfomas.

No LDGCB, a assinatura de 8 genes identificada nas plaquetas incluiu genes como DDAH1, PHGDH, RBM26, DDX27 e FPR3, previamente associados a processos como metabolismo celular, regulação de RNA e resposta imune.[89-105] Em conjunto, esses achados sugerem que as plaquetas podem refletir alterações sistêmicas induzidas pelo tumor, capturando aspectos relevantes da biologia tumoral.

Entre os genes identificados, PHGDH destaca-se por seu papel central na via de síntese de serina, uma rota metabólica fundamental para a proliferação celular. A ativação dessa via é característica da ativação de células B e da reação do

CG, sendo frequentemente observada em linfomas derivados dessas células. Estudos demonstram que a superexpressão de PHGDH está associada a pior prognóstico no LDGCB e que sua inibição pode induzir apoptose em células tumorais, reduzindo a progressão da doença.[89]

Outra dimensão crítica revelada pela assinatura plaquetária envolve genes associados ao metabolismo de RNA e à regulação da sobrevivência celular, como o DDX27 e RBM26. O DDX27, membro da família de helicases DEAD-box, participa de processos celulares críticos, incluindo proliferação, sobrevivência e resposta inflamatória. A superexpressão desse gene já foi associada ao crescimento tumoral, metástase e resistência terapêutica em diversos tipos de câncer.[90-95] De acordo com Yang et al.[97] o RBM26, que participa da degradação de RNA nuclear, tem sua expressão elevada em células-tronco cancerígenas, promotoras de metástase no carcinoma hepatocelular. Esta subpopulação foi caracterizada pela expressão elevada de RBM26.[96,97]

Por sua vez, o DDAH1 se conecta a mecanismos de regulação da proliferação, migração celular e angiogênese, processos intimamente associados à progressão tumoral e à metástase.[98] Alterações nesse gene têm sido implicadas na carcinogênese e na progressão tumoral em diferentes neoplasias, incluindo o LDGCB.[98-100]

A presença de FPR3 na assinatura sugere possíveis interações entre plaquetas e mecanismos de imunomodulação no microambiente tumoral. Receptores da família FPR estão envolvidos na regulação de respostas inflamatórias e na modulação da migração celular.[101,102] Estudos recentes indicam que a expressão elevada de FPR3 pode estar associada à infiltração imunológica, à polarização de macrófagos para fenótipos imunossupressores e ao mau prognóstico em diferentes tumores sólidos.[103-105]

Em conjunto, esses achados reforçam a hipótese de que as plaquetas podem refletir alterações sistêmicas induzidas pelo tumor, funcionando como sensores periféricos da biologia tumoral.

A assinatura plaquetária identificada no LH incluiu 28 genes, entre os quais se destacam FKBP3, TAB3, SKIL, STARD3, VASH1, ROBO1 e PTAFR, relacionados a processos como sinalização pró-tumoral, inflamação, regulação de plaquetas e transição epitélio-mesenquimal.

Entre os genes identificados, FKBP3 destaca-se por sua participação na regulação epigenética da expressão gênica. Essa proteína interage com histonas desacetilases como HDAC1 e HDAC2, modulando genes envolvidos no ciclo celular.[106] Em plaquetas, FKBP3 também atua como regulador positivo da ativação plaquetária ao facilitar a entrada de cálcio mediada pelo canal TRPC6.[107] Em contexto tumoral, sua superexpressão tem sido associada à progressão tumoral e à modulação da resposta imune, incluindo redução da atividade de células NK e linfócitos T CD8.[108] Embora seu papel específico no LH ainda não tenha sido descrito, estudos em malignidades de células B demonstram que a superexpressão de FKBP3 pode promover proliferação tumoral e aquisição de características de células-tronco.[109]

Outro eixo relevante da assinatura envolve genes associados à ativação de vias inflamatórias e de sinalização oncogênica. O TAB3, por exemplo, é essencial para a ativação da via NF-κB, estando implicada na proliferação de células tumorais e metástase linfonodal.[110,111] De forma complementar, o SKIL atua em diferentes tipos de câncer como modulador da via TGF-β, conhecida por seu papel na tumorigênese e na promoção de processos como transição epitélio-mesenquimal e invasão tumoral.[111,112]

Alterações no metabolismo lipídico também emergem como um possível componente da assinatura identificada. O gene STARD3, envolvido na transferência intracelular de colesterol, promove o acúmulo de colesterol mitocondrial, condição que pode inibir a apoptose e favorecer a sobrevivência celular.[113] Além disso, a superexpressão de STARD3 pode potencialmente estimular a esteroidogênese, favorecendo a promoção de neoplasias hormônio-dependentes, como câncer de mama e de próstata.[114,115] No câncer de mama, STARD3 encontra-se amplificado em aproximadamente 10% dos casos, geralmente associado ao amplicon HER2, onde contribui para a proliferação e metástase ao aumentar o colesterol de membrana e, consequentemente, potencializar a sinalização oncogênica.[115]

Mulheres sobreviventes ao LH apresentam risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama, atribuído principalmente à exposição à radiação da parede torácica.[116] Considerando esse contexto e as evidências de que as plaquetas são capazes de transferir RNAs e proteínas para outras células, levantamos a hipótese exploratória de que a expressão aumentada de STARD3 em plaquetas poderia representar um fator de risco aditivo para o desenvolvimento de carcinoma mamário nessas pacientes. Mecanisticamente, a presença de STARD3 em plaquetas e em

vesículas extracelulares secretadas por elas poderia possibilitar a transferência de mRNA para células epiteliais mamárias, alterando o metabolismo lipídico e ativando vias mitogênicas.[115,117] Em tecidos previamente irradiados, já mais suscetíveis à transformação maligna, esse mecanismo poderia contribuir para a iniciação ou promoção tumoral. Dessa forma, o STARD3 plaquetário poderia ser um fator de risco adicional, e a análise do transcriptoma plaquetário poderia ser utilizada como biomarcador de acompanhamento dessas pacientes. Estudos *in vitro*, modelos animais e análises prospectivas em coortes de sobreviventes de LH são necessários para testar essa possibilidade.

Adicionalmente, a assinatura do LH envolve genes associados à biologia plaquetária e à dinâmica do citoesqueleto. VASH1, uma destirosinase responsável pela modificação pós-traducional de α-tubulinas, participa da organização dos microtúbulos em megacariócitos e da formação de proplaquetas, podendo consequentemente influenciar a contagem plaquetária.[118]

Além de seu papel na biologia plaquetária, VASH1 tem sido descrita como reguladora da angiogênese tumoral, embora seu impacto prognóstico varie entre diferentes tipos de câncer. Em alguns tumores, níveis elevados de VASH1 foram associados a melhor sobrevida global e sobrevida livre de progressão.[119] Esses achados sugerem que o papel de VASH1 é altamente dependente do contexto celular e do microambiente tumoral. Nesse sentido, a maior expressão de VASH1 observada nas plaquetas de pacientes com LH poderia refletir, ao menos em parte, o perfil clínico mais favorável e a maior taxa de resposta terapêutica observada nessa coorte.

Por fim, genes relacionados à comunicação intercelular e ao microambiente também foram identificados na assinatura. Estudos recentes têm demonstrado que a expressão elevada de ROBO1 correlaciona-se positivamente com o estadiamento tumoral, metástase e com radiorresistência, além de atuar na transdução de sinal e parece ter importante ação inibitória sobre a função de plaquetas.[120-122]

O receptor codificado por PTAFR, por exemplo, integra o sistema PAF/PAFR, um importante mediador lipídico inflamatório implicado em angiogênese, metástase e comunicação entre células tumorais e células do estroma. Evidências indicam ainda que o eixo PTAFR/STAT3 pode modular a comunicação entre fibroblastos associados ao câncer e células tumorais, promovendo programas transcricionais pró-oncogênicos e regular a transição epitélio-mesenquimal.[123-125]

Esses dados reforçam o papel das plaquetas como mediadoras de comunicação intercelular e possíveis participantes ativas na fisiopatologia do LH.

Adicionalmente, comparamos o perfil de expressão de c-miRNAs no LH e no LDGCB. Identificamos 42 miRNAs diferencialmente expressos entre LH e LDGCB, sugerindo sua contribuição nas assinaturas moleculares específicas associadas a cada entidade clínica.

Em conjunto, a análise comparativa do perfil de c-miRNAs entre LH e LDGCB revelou assinaturas moleculares distintas que parecem refletir diferenças fundamentais na biologia dessas neoplasias.

A análise de enriquecimento de vias a partir dos alvos dos miRNAs mais expressos sugere que miRNAs como let-7e-5p, miR-30b-5p, miR-30c-5p e miR-505-5p formam uma rede regulatória no LH. Esses miRNAs têm sido descritos como supressores tumorais, levantando a hipótese de que possam estar envolvidos em mecanismos regulatórios que podem contribuir para um perfil biológico mais controlado. Essa possível regulação seria consistente com as características clínicas observadas na coorte de pacientes com LH, que apresentaram elevada taxa de remissão completa, menor estratificação de risco e ausência de desfechos desfavoráveis durante o acompanhamento. No entanto, estudos funcionais adicionais são necessários para confirmar essa hipótese e elucidar o papel desses miRNAs na biologia do LH.

O let-7e, desempenha um papel relevante como supressor tumoral, com expressão desregulada descrita em diferentes neoplasias, incluindo carcinoma retal, câncer colorretal, câncer de pulmão não de pequenas células e sarcomas. A redução de sua expressão tem sido consistentemente associada a fenótipos mais agressivos, incluindo maior potencial metastático, desdiferenciação tumoral e menor sobrevida global, além de contribuir para mecanismos de resistência à quimioterapia e radioterapia.[126] Além disso, o let-7e exerce papel importante na modulação da resposta inflamatória e imunológica, regulando a ativação de vias como NF-κB e TLR4. Nesse contexto, pode atuar como mediador pró-inflamatório e influenciar tanto a imunidade inata quanto adaptativa, participando do equilíbrio entre ativação imune e controle inflamatório.[126-128]

O miR-30b-5p tem sido descrito como um miRNA com função supressora tumoral em diferentes neoplasias, incluindo hepatocarcinoma, carcinoma espinocelular de esôfago e carcinoma de células renais.[129-131] Semelhantemente, miR-30c-5p tem sido descrito como um miRNA com função supressora tumoral, no câncer

gástrico e carcinoma espinocelular de esôfago.[132-134] Níveis elevados de miR-30b-5p e miR-30c-5p têm sido associados à inibição da proliferação celular, migração, transição epitélio-mesenquimal e metástase, refletindo um perfil biológico menos agressivo e um prognóstico mais favorável. Esses efeitos são mediados pela regulação de vias críticas envolvidas na tumorigênese, tais como a via PI3K/AKT.[129,133]

A desregulação do miR-505 tem sido descrita em uma ampla gama de cânceres, sendo majoritariamente associada a funções supressoras tumorais. Evidências indicam que esse miRNA atua na inibição da progressão tumoral por meio da regulação de vias de sinalização críticas, além de influenciar processos como remodelação da cromatina e metabolismo celular.[135]

Esse padrão de expressão de c-miRNAs no LH pode refletir uma doença mais homogênea e potencialmente menos agressiva, características que foram observadas na nossa coorte, a qual apresentou menor estratificação de risco e elevada taxa de remissão.

Em contraste, no LDGCB, a rede de interação mostrou-se mais restrita e composta por miRNAs como miR-4516, miR-4722 e miR-5787. O miR-4516 tem sido implicado na promoção tumoral em glioblastoma por meio da regulação de PTPN14, resultando na modulação da via Hippo.[136] Paralelamente, o miR-5787 apresenta um papel relevante na imunomodulação na leucemia mieloide aguda, sendo negativamente associado com células T CD8+ e subpopulações de células NK, sugerindo comprometimento da resposta imune antitumoral.[137] Esse conjunto de alterações sugere um microambiente tumoral mais permissivo à evasão imune e à progressão da doença. Assim, a assinatura observada no LDGCB reflete um estado biológico mais agressivo, que se alinha aos achados clínicos da coorte, incluindo pior estratificação prognóstica e desfechos desfavoráveis.

As redes de interação entre miRNAs e seus genes-alvo não apenas diferenciam molecularmente LH e LDGCB, mas também reforçam a hipótese de que os c-miRNAs circulantes podem refletir aspectos centrais da biologia tumoral e do comportamento clínico da doença. Quando comparamos o perfil molecular dos dois tipos de linfoma, a análise de enriquecimento de vias reguladas potencialmente reguladas por esses miRNAs, mostra que os miRNAs mais expressos no LH estão envolvidos em vias classicamente desreguladas na carcinogênese, como MAPK, FoxO, AMPK, HIF-1, p53, TGF-β, ciclo celular e apoptose. Interessantemente, a maioria desses miRNAs regula genes associados à carcinogênese viral e à infecção pelo EBV.

A infecção latente pelo EBV, presente em uma parcela significativa dos casos de LH, pode modular a expressão de miRNAs celulares envolvidos na sobrevivência e transformação de células B.[138-143] Tais alterações podem permanecer estáveis após o silenciamento viral, favorecendo um estado pró-transformação que, diante de novos estímulos, contribui para o desenvolvimento neoplásico tardio. Entre os miRNAs modulados, destaca-se o miR-155, cuja expressão é frequentemente aumentada em linfomas associados ao EBV e está relacionada à sobrevivência de células B transformadas.[144-146] Além do seu papel central na transformação maligna de células B, o miR-155 tem sido amplamente estudado como biomarcador circulante, estando associado ao diagnóstico, resposta terapêutica, recidiva e sobrevida de pacientes com diferentes tipos de linfoma.[43,44,49-51]

Em concordância com a literatura,[43,44,49-51,147] observamos maior expressão plasmática de miR-155 em pacientes com LH antes do tratamento e em estágios mais avançados da doença, além de níveis superiores quando comparados aos pacientes com LDGCB. Esses achados sugerem que mecanismos moleculares associados à infecção viral podem contribuir para o perfil de miRNAs observado no LH. Embora não tenha sido avaliado a presença do EBV neste trabalho, a investigação futura desse marcador poderá auxiliar na compreensão da contribuição viral para a modulação desses miRNAs.

A comparação entre amostras coletadas antes do tratamento e após a remissão revelou alterações significativas na expressão de diversos c-miRNAs, particularmente no LH. Entre os marcadores identificados, destacaram-se miR-146a, 145,1, miR-425 e miR-22, que apresentaram níveis elevados antes do tratamento, sugerindo possível associação com a presença da doença. De forma consistente com esses achados, esses miRNAs já foram descritos em estudos prévios de biópsia líquida como potenciais biomarcadores associados ao diagnóstico, monitoramento da doença e prognóstico em linfomas.[147-151]

O miR-146a, é reconhecido como modulador da resposta imune inata 3 encontra-se frequentemente reduzido em tecidos de linfomas de células B e T.[152-155] Entretanto, sua expressão circulante permanece inconsistente entre estudos. Enquanto Huang et al.[156] reportaram aumento de miR-146a sérico associado à predição de resposta e melhores desfechos[156] Zare et al.[157] não observaram variações significativas em amostras plasmáticas ou exossômicas de pacientes com LDGCB,

tampouco correlação com parâmetros clínicos, apontando para a necessidade de investigações adicionais sobre seu papel como biomarcador.[157]

O miR-27a tem emergido como um regulador relevante na linfogênese. Estudos conduzidos pelo grupo de Beheshti demonstraram que miR-27a e miR-155 circulantes integram uma assinatura precoce identificável até 12 meses antes da formação tumoral em modelo animal.[147] Em pacientes com LDGCB, níveis elevados de miR-27a no soro têm sido observados e associados a rearranjos de MYC, independentemente do estado clínico.[148]

O miR-22, por sua vez, tem se destacado pelo potencial prognóstico e preditivo no LDGCB. Sua expressão e secreção por células tumorais foram associadas à resposta terapêutica e à modulação da proliferação celular.[149] Embora um estudo exploratório tenha demonstrado variações significativas de miR-22 sérico após tratamento com R-CHOP, não foram observadas diferenças basais entre pacientes e controles saudáveis. Ainda assim, níveis elevados de miR-22 no diagnóstico associam-se a pior sobrevida livre de progressão, reforçando seu valor prognóstico.[150]

Em conjunto, os achados referentes ao miR-146a, miR-27a e miR-22 sugerem que esses miRNAs compõem um eixo regulatório associado à inflamação, proliferação e resposta terapêutica nos linfomas. Apesar das inconsistências entre alguns estudos, o padrão de superexpressão observado também nos estágios avançados de LH e LDGCB indica que esses miRNAs podem refletir a atividade biológica da doença e oferecem potencial como biomarcadores complementares às abordagens tradicionais, reforçando a utilidade da biópsia líquida na estratificação e acompanhamento desses pacientes.

A análise da expressão de miRNAs em diferentes estágios clínicos revelou aumento de diversos c-miRNAs em estágios mais avançados de ambos os linfomas. Entre os principais marcadores destacaram-se o miR-22, miR-20a, let-7i, miR-23a, miR-107, let-7a, miR-93, sugerindo que esses miRNAs podem refletir maior atividade biológica da doença e potencial agressividade tumoral. Estudos prévios também demonstraram a superexpressão de miR-20a em pacientes com LH clássico, cuja expressão elevada foi associada a pior resposta clínica à quimioterapia e maior taxa de mortalidade.[42,151] Consistente com esses achados, nossos dados revelaram maior expressão de miR-20a antes do tratamento no LH, assim como em estágios mais avançados da doença.

Embora pouco estudado no contexto de biópsia líquida, o let-7i-5p já foi avaliado em exossomos de pacientes com LDGCB como potencial biomarcador de resposta, mas sem resultados conclusivos. Zare et al., não observaram diferenças significativas na expressão de let-7i entre pacientes refratários, respondedores ou em tratamento com R-CHOP, tampouco associação com o estágio tumoral.[51] Em contraste, nossos resultados revelam aumento da expressão plasmática de let-7i antes do tratamento no LH e em estágios mais avançados de ambos LH e LDGCB. Interessantemente, em pacientes com esclerose múltipla, exossomos circulantes enriquecidos em let-7i foram associados à inibição da diferenciação de células T reguladoras (Tregs), mediada pela supressão de IGF1R e TGFBR1.[152] Esses dados sugerem que o aumento plasmático de let-7i também pode exercer um efeito imunorregulador nos linfomas, modulando a imunidade antitumoral e potencialmente contribuindo para a progressão da doença.

Embora o let-7a-5p ainda não tenha sido explorado no contexto do LDGCB, níveis elevados desse miRNA em vesículas extracelulares circulantes já foram descritos em pacientes com LH, tanto no diagnóstico quanto na predição de resposta terapêutica. Nossos resultados complementam esses achados prévios, a partir da identificação do aumento da expressão plasmática de let-7a-5p em estágios avançados do LH e LDGCB, sugerindo um papel potencial na progressão tumoral.

Khare et al.[151] relataram níveis reduzidos de miR-93 em pacientes com LH quando comparados a controles saudáveis. Contudo, observaram que o aumento desse miRNA estava associado a menor sobrevida global, sugerindo que sua expressão pode variar dinamicamente ao longo da evolução tumoral.[151] Em consonância com esse padrão, em nossos achados a superexpressão de miR-93-5p foi uma característica marcante dos estágios avançados tanto do LH quanto do LDGCB, reforçando sua associação com maior agressividade e alinhando-se às evidências prévias de seu valor prognóstico.

Entretanto, diferentemente do observado pelos autores, em nossa coorte de LH o miR-93 apresentou regulação positiva antes do tratamento. Essa divergência possivelmente decorre do tipo de comparação empregada, uma vez que nosso estudo utilizou análises pareadas, enquanto Khare et al.[151] avaliaram diferenças em relação a indivíduos saudáveis. Essa distinção metodológica pode explicar as diferenças observadas e destaca a importância do contexto comparativo na interpretação de miRNAs circulantes como biomarcadores.

Em relação ao perfil de c-miRNAs com potencial preditor de resposta no LDGCB, identificamos apenas o miR-140-3p. Esse miRNA já foi previamente descrito em LH, apresentando expressão elevada na presença da doença em comparação a indivíduos saudáveis.[151] Consistente com esses achados, nossas amostras exibiram maior expressão de miR-140 antes do tratamento também no LH. Embora ainda pouco explorado no contexto dos linfomas, esses padrões distintos sugerem que miR-140-3p pode desempenhar um papel relevante na progressão tumoral de maneira dependente do contexto biológico. Esses resultados reforçam a necessidade de estudos adicionais para esclarecer seus mecanismos regulatórios e avaliar seu potencial como biomarcador em biópsia líquida.

No LDGCB, alguns miRNAs também apresentaram associação com desfechos clínicos desfavoráveis. A maior expressão de miR-15a, miR-425 e miR-532 foi observada em pacientes que evoluíram para óbito durante o período de acompanhamento, sugerindo potencial papel prognóstico desses marcadores. O miR-15a, anteriormente descrito como elevado no soro de pacientes com LDGCB em comparação a controles saudáveis, mostrou-se associado ao pior prognóstico, corroborando seu possível envolvimento em vias relacionadas à progressão tumoral.[148] Interessantemente, resultados contraditórios foram relatados por Hatiboglu et al., que não observaram elevação sérica, mas detectaram aumento exossômico no líquido cefalorraquidiano de pacientes com linfoma de sistema nervoso central.[153] A ausência de diferença na expressão de miR-15a em CTCs derivadas de pacientes com LDGCB reforça a hipótese de que a fração extracelular representa melhor a atividade biológica desse miRNA no contexto oncológico.[153] Esses dados indicam que o compartimento biológico analisado pode influenciar a detecção e a interpretação dos níveis de miR-15a. Nossos achados corroboram com a literatura ao demonstrar que a expressão elevada de miR-15a ocorre não apenas em estágios avançados e desfecho desfavorável no LDGCB, mas também no LH, particularmente antes do tratamento e na doença avançada. Esses dados sugerem que o miR-15a extracelular circulante pode refletir mecanismos compartilhados de resistência tumoral e progressão em diferentes subtipos de linfomas.

De forma semelhante, o miR-532-5p, embora ainda pouco explorado em linfomas, apresentou expressão aumentada em pacientes com LDGCB e tendência de associação a desfechos desfavoráveis. Estudos prévios já haviam demonstrado elevação de miR-532 no plasma e soro de pacientes com LDGCB e em

colangiocarcinoma extra-hepático, ainda que sem correlação com parâmetros clínico-patológicos.[151,154] Adicionalmente, nossos resultados apontam pela primeira vez um possível papel prognóstico desse miRNA no contexto dos linfomas, especialmente em estágios mais avançados da doença.

Tomados em conjunto, esses achados indicam que tanto o miR-15a quanto o miR-532-5p podem integrar um painel de biomarcadores circulantes úteis para a estratificação prognóstica no LDGCB. No entanto, estudos multicêntricos e longitudinais, com amostras representativas e padronização dos compartimentos biológicos analisados, serão essenciais para confirmar esses resultados e elucidar os mecanismos moleculares que vinculam a expressão desses miRNAs à biologia agressiva dos linfomas.

Embora diversos miRNAs apresentem concordância com a maioria dos estudos de biópsia líquida em linfomas, os resultados referentes ao miR-425, miR-107 e miR-23a não foram completamente concordantes com a literatura disponível, que frequentemente reporta padrões opostos de regulação.[151, 155, 158-160] Essas divergências não são incomuns em estudos de biópsia líquida, especialmente considerando diferenças metodológicas, o tipo de amostra analisada (plasma, soro, exossomos), heterogeneidade clínica, número amostral e, principalmente, o tipo de comparação utilizado. Enquanto grande parte dos trabalhos compara pacientes com indivíduos saudáveis, nosso estudo priorizou análises intra-coorte, contrastando momentos distintos da evolução clínica ou subgrupos de pacientes dentro do mesmo tipo de linfoma. Essa abordagem pode revelar assinaturas associadas à progressão e agressividade tumoral, que muitas vezes não se manifestam em comparações estáticas com controles saudáveis. Em conjunto, esses resultados reforçam que a interpretação da expressão de miRNAs circulantes requer cautela e deve considerar o desenho do estudo, o contexto clínico e o tipo de amostra analisada.

Apesar da relevância dos achados, algumas limitações devem ser reconhecidas. O número de pacientes incluídos foi pequeno, o que pode restringir a generalização e aplicabilidade real dos resultados. O uso de *microarray,* embora robusto, poderia ser complementado por tecnologias de maior sensibilidade, como o sequenciamento de nova geração. Além disso, embora o acompanhamento mediano de 41 meses represente um período relevante, a análise longitudinal de todos os pacientes foi limitada, o que limitaria conclusões sobre predição de prognóstico.

Como perspectivas futuras, destacamos a necessidade de validação dos achados em coortes independentes e multicêntricas, com maior número de pacientes e acompanhamento clínico prolongado. A integração de painéis combinados de mRNAs plaquetários e c-miRNAs, poderá contribuir para a construção de modelos preditivos mais robustos e acurados. De fato, estudos prévios têm demonstrado que a combinação de múltiplos biomarcadores apresenta desempenho superior em comparação à análise isolada, resultando em maior acurácia na detecção tumoral.[161-163] Além disso, a expansão dessa abordagem para outros subtipos de linfomas e neoplasias hematológicas poderá ampliar sua aplicabilidade clínica.

Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que c-miRNAs e mRNAs plaquetários constituem biomarcadores promissores para o entendimento da biologia dos linfomas e para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas, prognósticas e de monitoramento minimamente invasivas. Além disso, este trabalho documenta pela primeira vez a modulação do transcriptoma plaquetário em linfomas, ampliando as perspectivas de aplicação dessa abordagem. Esses achados contribuem para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos moleculares associados ao comportamento clínico dessas neoplasias e reforçam o potencial da biópsia líquida como ferramenta complementar na oncologia hematológica e na medicina personalizada.

5 CONCLUSÕES

1. A caracterização molecular dos linfomas por meio de biomarcadores circulantes tem se destacado como uma estratégia promissora no contexto da biópsia líquida. Neste estudo, foram caracterizados os perfis de miRNAs circulantes no plasma de pacientes com LH e LDGCB antes do tratamento e após a remissão completa. Os resultados demonstraram perfis dinâmicos de c-miRNAs, evidenciando alterações moleculares associadas à resposta terapêutica e à evolução da doença. Em conjunto, os achados reforçam o potencial dos miRNAs circulantes como biomarcadores promissores no contexto da biópsia líquida em oncologia hematológica, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens minimamente invasivas para caracterização molecular, diagnóstico, estratificação prognóstica e monitoramento terapêutico;

2. A avaliação do transcriptoma plaquetário permitiu caracterizar assinaturas moleculares distintas entre o LH e LDGCB, evidenciando, pela primeira vez neste contexto, a modulação do transcriptoma plaquetário em pacientes com linfoma e demonstrando diferenças na regulação da expressão gênica entre essas duas entidades clínicas;

3. A avaliação do perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LH e LDGCB identificou perfis distintos de expressão, revelando assinaturas moleculares específicas associadas a cada entidade clínica;

4. Comparando os c-miRNAs diferencialmente expressos com dados previamente descritos na literatura, constatamos que a maioria dos c-miRNAs previamente descritos como modulados em linfomas teve sua expressão alterada também em nossa coorte. As diferenças de expressão foram observadas nas diferentes comparações, permitindo destacar a relevância biológica dessas biomoléculas e ampliar as perspectivas de estudos mais aprofundados;

5. No que se refere ao objetivo de investigar a modulação dos c-miRNAs após o tratamento do LH, identificamos diferenças significativas na expressão de inúmeros c-miRNAs no plasma de pacientes com LH antes e depois do tratamento. Entre os miRNAs avaliados, destacaram-se miR-146a, miR-27a e miR-22, que apresentaram expressão aumentada antes do tratamento;

6. Atendendo ao objetivo de avaliar a expressão de c-miRNAs em diferentes estágios clínicos do LH, identificamos c- miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes em diferentes estágios da doença. Os c-miRNAS miR-146a, miR-27a, miR-22, miR-20a, let-7i, let-7a, miR-93, miR-15a, miR-532 apresentaram regulação positiva nos pacientes classificados em estágios mais avançados da doença ao diagnóstico;

7. Em consonância com o objetivo de comparar o perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LDGCB antes do tratamento e após remissão completa, identificamos diferença na expressão de apenas três c-miRNAs. O miR-140 foi o único marcador associado a resposta no LDGCB, previamente descrito em literatura;

8. A avaliação dos diferentes estágios clínicos do LDGCB demonstrou, de forma semelhante ao observado no LH, maior expressão de miR-146a, miR-27a, miR-22, miR-20a, let-7i, let-7a, miR-93, miR-15a e miR-532 nos pacientes classificados em estágios mais avançados da doença ao diagnóstico. Esses achados sugerem uma associação desses c-miRNAs com a extensão da doença e destacam seu potencial para investigação como biomarcadores prognósticos em neoplasias de células B;

9. Ao comparar o perfil de expressão de c-miRNAs no plasma de pacientes com LDGCB com diferentes desfechos, observamos aumento na expressão do miR-15a e miR-532. A superexpressão desses c-miRNAs também foi identificada nos estágios mais avançados do LDGCB.

6 REFERÊNCIAS

1. Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: b-cell non-Hodgkin lymphomas. Expert Rev Hematol. 2017;10(5):405-15.

2. Connors JM, Cozen W, Steidl C, Carbone A, Hoppe RT, Flechtner HH, et al. Hodgkin lymphoma. Nat Rev Dis Primers. 2020;6(1):61. Erratum in: Nat Rev Dis Primers. 2021;7(1):79.

3. Sehn LH, Salles G. Diffuse large B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2021;384(9):842-58.

4. Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. Expert Rev Hematol. 2017;10(3):239-49.

5. Momotow J, Borchmann S, Eichenauer DA, Engert A, Sasse S. Hodgkin lymphoma-review on pathogenesis, diagnosis, current and future treatment approaches for adult patients. J Clin Med. 2021;10(5):1125.

6. Caponetti G, Bagg A. Demystifying the diagnosis and classification of lymphoma: a hematologist/oncologist's guide to the hematopathologist's galaxy. J Community Support Oncol. 2017;15(1):43-8.

7. Patil S, Rajput S, Patil S, Mhaiskar A. B-cell lymphoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and targeted therapies. Pathol Res Pract. 2025;271:156036.

8. Kaseb H, Babiker HM. Hodgkin Lymphoma. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 [updated 2023 Jun 26] [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499969/.

9. Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Poetsch M, Grote W, Schlegelberger B. Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. Blood. 1995;86(4):1464-8.

10. Rengstl B, Newrzela S, Heinrich T, Weiser C, Thalheimer FB, Schmid F, et al. Incomplete cytokinesis and re-fusion of small mononucleated Hodgkin cells lead to giant multinucleated Reed-Sternberg cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110(51):20729-34.

11. Weniger MA, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. Leukemia. 2021;35(4):968-81.

12. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. Blood. 2000;95(4):1443-50.

13. Li S, Yang C, Li J, Liu Z, Gong F, Ke X, et al. MYC-mediated transcriptional control of splicing factors promotes RNA splicing in activated B lymphocytes. Sci Rep. 2025;15(1):42598.

14. Calado DP, Sasaki Y, Godinho SA, Pellerin A, Köchert K, Sleckman BP, et al. The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. Nat Immunol. 2012;13(11):1092-100.

15. Weniger MA, Tiacci E, Schneider S, Arnolds J, Rüschenbaum S, Duppach J, et al. Human CD30+ B cells represent a unique subset related to Hodgkin lymphoma cells. J Clin Invest. 2018;128(7):2996-3007.

16. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, Giulino-Roth L, Tam W, Liu Y, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Blood. 2015;125(7):1061-72.

17. Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G, Penson A, Fortini E, Pettirossi V, et al. Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2018;131(22):2454-65.

18. Wienand K, Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Wu D, Kim J, et al. Genomic analyses of flow-sorted Hodgkin Reed-Sternberg cells reveal complementary mechanisms of immune evasion. Blood Adv. 2019;3(23):4065-80.

19. Weniger MA, Küppers R. NF-κB deregulation in Hodgkin lymphoma. Semin Cancer Biol. 2016;39:32-9.

20. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kägi D, Ho A, et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. J Exp Med. 1999;189(12):1939-46.

21. Lamprecht B, Kreher S, Anagnostopoulos I, Jöhrens K, Monteleone G, Jundt F, et al. Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. Blood. 2008;112(8):3339-47.

22. Scheeren FA, Diehl SA, Smit LA, Beaumont T, Naspetti M, Bende RJ, et al. IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. Blood. 2008;111(9):4706-15.

23. Cattaruzza L, Gloghini A, Olivo K, Di Francia R, Lorenzon D, De Filippi R, et al. Functional coexpression of Interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: involvement of IL-7 in tumor cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma. Int J Cancer. 2009;125(5):1092-101.

24. Fernández S, Solórzano JL, Díaz E, Menéndez V, Maestre L, Palacios S, et al. JAK/STAT blockade reverses the malignant phenotype of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Blood Adv. 2023;7(15):4135-47.

25. Sander S, Chu VT, Yasuda T, Franklin A, Graf R, Calado DP, et al. PI3 Kinase and FOXO1 transcription factor activity differentially control b cells in the germinal center light and dark zones. Immunity. 2015;43(6):1075-86.

26. Xie L, Ushmorov A, Leithäuser F, Guan H, Steidl C, Färbinger J, et al. FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2012;119(15):3503-11.

27. Dutton A, Reynolds GM, Dawson CW, Young LS, Murray PG. Constitutive activation of phosphatidyl-inositide 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. J Pathol. 2005;205(4):498-506.

28. Vrzalikova K, Ibrahim M, Vockerodt M, Perry T, Margielewska S, Lupino L, et al. S1PR1 drives a feedforward signalling loop to regulate BATF3 and the transcriptional programme of Hodgkin lymphoma cells. Leukemia. 2018;32(1):214-23. Erratum in: Leukemia. 2019;33(8):2126.

29. Sánchez-Beato M, Méndez M, Guirado M, Pedrosa L, Sequero S, Yanguas-Casás N, et al. A genetic profiling guideline to support diagnosis and clinical management of lymphomas. Clin Transl Oncol. 2024;26(5):1043-62.

30. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC, et al. The international consensus classification of mature lymphoid neoplasms: a report from the clinical advisory committee. Blood. 2022;140(11):1229-53. Erratum in: Blood. 2023;141(4):437.

31. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. Blood. 2015;125(1):22-32.

32. Weber T, Schmitz R. Molecular subgroups of diffuse large B cell lymphoma: biology and implications for clinical practice. Curr Oncol Rep. 2022;24(1):13-21.

33. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2018;378(15):1396-407.

34. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. Nat Med. 2015;21(8):922-6.

35. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. EMBO Mol Med. 2015;7(1):1-11.

36. Takizawa S, Matsuzaki J, Ochiya T. Circulating microRNAs: challenges with their use as liquid biopsy biomarkers. Cancer Biomark. 2022;35(1):1-9.

37. Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E, van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M, et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. Blood. 2011;118(13):3680-3.

38. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(8):509-24.

39. Precazzini F, Detassis S, Imperatori AS, Denti MA, Campomenosi P. Measurements methods for the development of microRNA-based tests for cancer diagnosis. Int J Mol Sci. 2021;22(3):1176.

40. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Br J Haematol. 2008;141(5):672-5.

41. Metcalf GA. MicroRNAs: circulating biomarkers for the early detection of imperceptible cancers via biosensor and machine-learning advances. Oncogene. 2024;43(28):2135-42.

42. Hernández-Walias FJ, Vázquez E, Pacheco Y, Rodríguez-Fernández JM, Pérez-Elías MJ, Dronda F, et al. Risk, diagnostic and predictor factors for classical Hodgkin lymphoma in HIV-1-infected individuals: role of plasma exosome-derived miR-20a and miR-21. J Clin Med. 2020;9(3):760.

43. Ji Q, Jiang T, Su J, Zhang S, Li C, Yang X, et al. Serum miR-21 predicts the prognosis of patients with primary gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma. Acta Biochim Pol. 2022;69(2):379-85.

44. Abou Elnour ES, El Sayed IE, Mohamed Abd Elbary H, Sohaib A, Amin Mohammed Atia S, El Sayed Ramadan Genena S. Biochemical and clinical impacts of miR-150 and miR-21 expression levels in diffuse large B-cell lymphoma. J Immunoassay Immunochem. 2022;43(6):648-64.

45. Asker HA, Khorshed EN, Ahmed MR, Refaat LA, Khaled HM, Rashed RA. Prognostic values of microRNA-21 and Ki-67 in diffuse large B-cell lymphoma patients: Egyptian experience. Clin Lab. 2021;67(7).

46. Cui Q, Vari F, Cristino AS, Salomon C, Rice GE, Sabdia MB, et al. Circulating cell-free miR-494 and miR-21 are disease response biomarkers associated with interim-positron emission tomography response in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Oncotarget. 2018;9(78):34644-57.

47. Li J, Fu R, Yang L, Tu W. miR-21 expression predicts prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(11):15019-24.

48. Ren JL, Cui LZ, Hao XX, Li XY. [Correlation between miR-21, miR-191 and clinical stage of patients with diffuse large B-cell lymphoma]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2023;31(1):115-9. Chinese.

49. Sun R, Zheng Z, Wang L, Cheng S, Shi Q, Qu B, et al. A novel prognostic model based on four circulating miRNA in diffuse large B-cell lymphoma: implications for the roles of MDSC and Th17 cells in lymphoma progression. Mol Oncol. 2021;15(1):246-61.

50. Ahmadvand M, Eskandari M, Pashaiefar H, Yaghmaie M, Manoochehrabadi S, Khakpour G, et al. Over expression of circulating miR-155 predicts prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. Leuk Res. 2018;70:45-8.

51. Zare N, Haghjooy Javanmard S, Mehrzad V, Eskandari N, Kefayat A. Evaluation of exosomal miR-155, let-7g and let-7i levels as a potential noninvasive biomarker among refractory/relapsed patients, responsive patients and patients receiving R-CHOP. Leuk Lymphoma. 2019;60(8):1877-89.

52. Drees EE, Roemer MG, Groenewegen NJ, Perez-Boza J, van Eijndhoven MA, Prins LI, et al. Extracellular vesicle miRNA predict FDG-PET status in patients with classical Hodgkin Lymphoma. J Extracell Vesicles. 2021;10(9):e12121.

53. Jones K, Nourse JP, Keane C, Bhatnagar A, Gandhi MK. Plasma microRNA are disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res. 2014;20(1):253-64.

54. Salzmann RJ, Garbin A, Gaffo E, Elia C, Martire G, Bortoluzzi S, et al. Extracellular vesicle miR-122-5p as a prognostic biomarker in pediatric classical Hodgkin lymphoma. Int J Mol Sci. 2024;25(24):13243.

55. Altamemi IA, Al-Khazaali AS. Expression levels of miRNA-155 in Hodgkin lymphoma patients. Biochem Cell Arch. 2020;20(1):2075-80.

56. Machlus KR, Italiano JE Jr. The incredible journey: from megakaryocyte development to platelet formation. J Cell Biol. 2013;201(6):785-96.

57. Bailey SE, Ukoumunne OC, Shephard EA, Hamilton W. Clinical relevance of thrombocytosis in primary care: a prospective cohort study of cancer incidence using English electronic medical records and cancer registry data. Br J Gen Pract. 2017;67(659):e405-13. Erratum in: Br J Gen Pract. 2021;71(711):445.

58. Abdulrahman GO, Das N, Lutchman Singh K. The predictive role of thrombocytosis in benign, borderline and malignant ovarian tumors. Platelets. 2020;31(6):795-800.

59. Stone RL, Nick AM, McNeish IA, Balkwill F, Han HD, Bottsford-Miller J, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. N Engl J Med. 2012;366(7):610-8. Erratum in: N Engl J Med. 2012;367(18):1768. Lamkin, Donald [added].

60. Josa V, Ferenczi S, Szalai R, Fuder E, Kuti D, Horvath K, et al. Thrombocytosis and effects of IL-6 knock-out in a colitis-associated cancer model. Int J Mol Sci. 2020;21(17):6218.

61. Randi ML, Rossi C, Barbone E, Pietrogrande F, Girolami A. Incidence of thrombocytosis in lymphomas. Leuk Lymphoma. 1992;7(1-2):139-41.

62. Ni J, Wang YQ, Zhang YP, Wu W, Zeng QS, Yang MZ, et al. [Value of neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio for prognostic evaluation of diffuse large B-cell lymphoma]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2016;24(2):427-32. Chinese.

63. Guthrie GJ, Charles KA, Roxburgh CS, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2013;88(1):218-30.

64. Ilkkilic K, Sen B, Cure O. The role of platelet to lymphocyte ratio (PLR) in predicting early treatment response in diffuse large B-cell lymphoma. Indian J Hematol Blood Transfus. 2025;41(2):333-9.

65. Cai C, Zeng W, Wang H, Ren S. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) and monocyte-to-lymphocyte ratio (MLR) as biomarkers in diagnosis evaluation of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective, observational study. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2024;19:933-43.

66. Keam B, Ha H, Kim TM, Jeon YK, Lee SH, Kim DW, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio improves prognostic prediction of International Prognostic Index for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. Leuk Lymphoma. 2015;56(7):2032-8.

67. Wang S, Ma Y, Sun L, Shi Y, Jiang S, Yu K, et al. Prognostic significance of pretreatment neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio in patients with diffuse large B-cell lymphoma. BioMed Res Int. 2018;2018:9651254.

68. Chen Y, Zhang Z, Fang Q, Jian H. Prognostic impact of platelet-to-lymphocyte ratio on diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. Cancer Cell Int. 2019;19(1):245.

69. Zhang Q, Song X, Song X. Contents in tumor-educated platelets as the novel biosource for cancer diagnostics. Front Oncol. 2023;13:1165600.

70. Repsold L, Pool R, Karodia M, Tintinger G, Joubert AM. An overview of the role of platelets in angiogenesis, apoptosis and autophagy in chronic myeloid leukaemia. Cancer Cell Int. 2017;17(1):89.

71. Trousseau A. Lectures on clinical medicine. London: The New Sydenham Society; 1868.

72. Billroth T. Lectures on surgical pathology and therapeutics: a handbook for students and practitioners. London: The New Sydenham Society; 1877.

73. In 't Veld SG, Wurdinger T. Tumor-educated platelets. Blood. 2019;133(22):2359-64.

74. Ding S, Dong X, Song X. Tumor educated platelet: the novel BioSource for cancer detection. Cancer Cell Int. 2023;23(1):91.

75. Zarà M, Canobbio I, Visconte C, Canino J, Torti M, Guidetti GF. Molecular mechanisms of platelet activation and aggregation induced by breast cancer cells. Cell Signal. 2018;48:45-53.

76. Li S, Lu Z, Wu S, Chu T, Li B, Qi F, et al. The dynamic role of platelets in cancer progression and their therapeutic implications. Nat Rev Cancer. 2024;24(1):72-87.

77. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111(30):E3053-61.

78. Qi Y, Chen W, Liang X, Xu K, Gu X, Wu F, et al. Novel antibodies against GPIbα inhibit pulmonary metastasis by affecting vWF-GPIbα interaction. J Hematol Oncol. 2018;11(1):117.

79. Rodriguez-Martinez A, Simon-Saez I, Perales S, Garrido-Navas C, Russo A, de Miguel-Perez D, et al. Exchange of cellular components between platelets and tumor cells: impact on tumor cells behavior. Theranostics. 2022;12(5):2150-61.

80. Liu X, Song J, Zhang H, Liu X, Zuo F, Zhao Y, et al. Immune checkpoint HLA-E:CD94-NKG2A mediates evasion of circulating tumor cells from NK cell surveillance. Cancer Cell. 2023;41(2):272-87.e9.

81. Melchinger H, Jain K, Tyagi T, Hwa J. Role of platelet mitochondria: life in a nucleus-free zone. Front Cardiovasc Med. 2019;6:153.

82. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. J Cell Biol. 2001;154(3):485-90.

83. Burciaga-Hernandez LA, Cueto-Villalobos CF, Ortega-Piñon N, Gonzalez-Curiel IE, Godina-Gonzalez S, Mendez-Frausto G, et al. Gene expression behavior of a set of genes in platelet and tissue samples from patients with breast cancer. Int J Mol Sci. 2023;24(9):8348.

84. Xing S, Zeng T, Xue N, He Y, Lai YZ, Li HL, et al. Development and validation of tumor-educated blood platelets integrin Alpha 2b (ITGA2B) RNA for diagnosis and prognosis of non-small-cell lung cancer through RNA-seq. Int J Biol Sci. 2019;15(9):1977-92.

85. Yang L, Jiang Q, Li DZ, Zhou X, Yu DS, Zhong J. TIMP1 mRNA in tumor-educated platelets is diagnostic biomarker for colorectal cancer. Aging (Albany NY). 2019;11(20):8998-9012.

86. In 't Veld SG, Arkani M, Post E, Antunes-Ferreira M, D'Ambrosi S, Vessies DC, et al. Detection and localization of early- and late-stage cancers using platelet RNA. Cancer Cell. 2022;40(9):999-1009.e6.

87. Rolf N, Knoefler R, Suttorp M, Klüter H, Bugert P. Optimized procedure for platelet RNA profiling from blood samples with limited platelet numbers. Clin Chem. 2005;51(6):1078–80.

88. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics. 2003;4(2):249-64.

89. D'Avola A, Legrave N, Tajan M, Chakravarty P, Shearer RL, King HW, et al. PHGDH is required for germinal center formation and is a therapeutic target in MYC-driven lymphoma. J Clin Invest. 2022;132(9):e153436.

90. Zheng Y, Chen X, Huang Y, Lin X, Lin J, Mo Y, et al. DDX27: an RNA helicase regulating cancer progression and therapeutic prospects. Int J Biol Macromol. 2025;313:144388.

91. Xiaoqian W, Bing Z, Yangwei L, Yafei Z, Tingting Z, Yi W, et al. DEAD-box helicase 27 Promotes hepatocellular carcinoma progression through ERK signaling. Technol Cancer Res Treat. 2021;20:15330338211055953.

92. Tsukamoto Y, Fumoto S, Noguchi T, Yanagihara K, Hirashita Y, Nakada C, et al. Expression of DDX27 contributes to colony-forming ability of gastric cancer cells and correlates with poor prognosis in gastric cancer. Am J Cancer Res. 2015;5(10):2998-3014.

93. Li S, Ma J, Zheng A, Song X, Chen S, Jin F. DEAD-box helicase 27 enhances stem cell-like properties with poor prognosis in breast cancer. J Transl Med. 2021;19(1):334.

94. Tang J, Chen H, Wong CC, Liu D, Li T, Wang X, et al. DEAD-box helicase 27 promotes colorectal cancer growth and metastasis and predicts poor survival in CRC patients. Oncogene. 2018;37(22):3006-21.

95. Li G, Li R, Wang W, Sun M, Wang X. DDX27 regulates oral squamous cell carcinoma development through targeting CSE1L. Life Sci. 2024;340:122479.

96. Silla T, Schmid M, Dou Y, Garland W, Milek M, Imami K, et al. The human ZC3H3 and RBM26/27 proteins are critical for PAXT-mediated nuclear RNA decay. Nucleic Acids Res. 2020;48(5):2518-30.

97. Yang C, Li Y, Wang Z, Shan H, Zhang G, Meng X, et al. Identification of a cancer stem cell-like subpopulation that promotes HCC metastasis. JHEP Rep Innov Hepatol. 2024;7(5):101302.

98. Reddy KR, Dasari C, Duscharla D, Supriya B, Ram NS, Surekha MV, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 (DDAH1) is frequently upregulated in prostate cancer, and its overexpression conveys tumor growth and angiogenesis by metabolizing asymmetric dimethylarginine (ADMA). Angiogenesis. 2018;21(1):79-94.

99. Hulin JA, Gubareva EA, Jarzebska N, Rodionov RN, Mangoni AA, Tommasi S. Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) enzymes as an emerging therapeutic strategy to target angiogenesis and vasculogenic mimicry in cancer. Front Oncol. 2020;9:1455.

100. Hulin JA, Tommasi S, Elliot D, Mangoni AA. Small molecule inhibition of DDAH1 significantly attenuates triple negative breast cancer cell vasculogenic mimicry *in vitro*. Biomed Pharmacother. 2019;111:602-12.

101. Weiß E, Kretschmer D. Formyl-peptide receptors in infection, inflammation, and cancer. Trends Immunol. 2018;39(10):815-29.

102. Salamah MF, Ravishankar D, Vaiyapuri R, Moraes LA, Patel K, Perretti M, et al. The formyl peptide fMLF primes platelet activation and augments thrombus formation. J Thromb Haemost. 2019;17(7):1120-33.

103. Ye C, Li P, Chen B, Mo Y, Huang Q, Li Q, et al. Pan-cancer analysis and experimental validation of FPR3 as a prognostic and immune infiltration-related biomarker for glioma. Front Genet. 2024;15:1466617.

104. Chen Y, Tang X, Zhu L, Wang Y, Li G, Yang W. FPR3 orchestrates macrophage polarization in breast cancer: multi-omics dissection of prognostic relevance and therapeutic targeting. Cancer Cell Int. 2025;25(1):306.

105. Sun M, Tan Z, Lin K, Chang Z, Yang Z, Yang X, et al. FPR3 sustains the immunosuppression of tumor-associated macrophages and accelerates the progression of gastric adenocarcinoma. Oncogene. 2025;44(44):4309–23.

106. Ke H, Chen Z, Chen L, Zhang H, Wang Y, Song T, et al. FK506-binding proteins: emerging target and therapeutic opportunity in multiple tumors. Int J Biol Macromol. 2025;307(Pt 1):141914.

107. Lopez E, Berna-Erro A, Salido GM, Rosado JA, Redondo PC. FKBP25 and FKBP38 regulate non-capacitative calcium entry through TRPC6. Biochim Biophys Acta. 2015;1853(10 10 Pt A):2684–96.

108. Li S, Yang L, Li J. FKBP3, a poor prognostic indicator, promotes the progression of LUAD via regulating ferroptosis and immune infiltration. Medicine (Baltimore). 2024;103(26):e38606.

109. Xing X, Liu M, Wang X, Guo Q, Wang H, Wang W. FKBP3 aggravates the malignant phenotype of diffuse large B-cell lymphoma by PARK7-mediated activation of Wnt/β-catenin signalling. J Cell Mol Med. 2024;28(1):e18041.

110. Zhao J, Gai L, Gao Y, Xia W, Shen D, Lin Q, et al. TAB3 promotes human esophageal squamous cell carcinoma proliferation and invasion via the NF-κB pathway. Oncol Rep. 2018;40(5):2876-85.

111. Wang C, Song W, Zhang Y, Deng H, Zhou Z, Zhu J, et al. SKIL promotes pancreatic cancer metastasis by inhibiting TSPYL2 to activate the TGF-β pathway. Cancer Innov. 2025;4(3):e70011.

112. Ma F, Ding MG, Lei YY, Luo LH, Jiang S, Feng YH, et al. SKIL facilitates tumorigenesis and immune escape of NSCLC via upregulating TAZ/autophagy axis. Cell Death Dis. 2020;11(12):1028.

113. Asif K, Memeo L, Palazzolo S, Frión-Herrera Y, Parisi S, Caligiuri I, et al. STARD3: a prospective target for cancer therapy. Cancers (Basel). 2021;13(18):4693.

114. Stigliano A, Gandini O, Cerquetti L, Gazzaniga P, Misiti S, Monti S, et al. Increased metastatic lymph node 64 and CYP17 expression are associated with high stage prostate cancer. J Endocrinol. 2007;194(1):55-61. Erratum in: J Endocrinol. 2007;194(2):458.

115. Vassilev B, Sihto H, Li S, Hölttä-Vuori M, Ilola J, Lundin J, et al. Elevated levels of StAR-related lipid transfer protein 3 alter cholesterol balance and adhesiveness of breast cancer cells: potential mechanisms contributing to progression of HER2-positive breast cancers. Am J Pathol. 2015;185(4):987-1000.

116. Wong SM. Best practice & research clinical haematology: screening for breast cancer in Hodgkin lymphoma survivors. Best Pract Res Clin Haematol. 2023;36(4):101525.

117. Morales-Pacheco M, Valenzuela-Mayen M, Gonzalez-Alatriste AM, Mendoza-Almanza G, Cortés-Ramírez SA, Losada-García A, et al. The role of platelets in cancer: from their influence on tumor progression to their potential use in liquid biopsy. Biomark Res. 2025;13(1):27.

118. Moog S, Mallo L, Eckly A, Janke C, Pujol A, Iruzubieta P, et al. Importance of tubulin detyrosination in platelet biogenesis. J Thromb Haemost. 2025;23(6):2025-34.

119. Liu S, Han B, Sun M, Wang J, Sun Y, Wang Y. Significance of vasohibin 1 in cancer patients: a systematic review and meta analysis. J Cancer Res Ther. 2022;18(2):567-75.

120. Zhai C, Sun X, Zhang S, Xing L. ROBO1 enhanced esophageal carcinoma cell radioresistance through accelerating G3BP2-mediated eIF3A degradation. Cell Death Dis. 2025;16(1):256.

121. Schmid BC, Rezniczek GA, Fabjani G, Yoneda T, Leodolter S, Zeillinger R. The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2007;106(3):333-42.

122. Patel S, Huang YW, Reheman A, Pluthero FG, Chaturvedi S, Mukovozov IM, et al. The cell motility modulator Slit2 is a potent inhibitor of platelet function. Circulation. 2012;126(11):1385-95.

123. Hou T, Lou Y, Li S, Zhao C, Ji Y, Wang D, et al. Kadsurenone is a useful and promising treatment strategy for breast cancer bone metastases by blocking the PAF/PTAFR signaling pathway. Oncol Lett. 2018;16(2):2255-62.

124. Chen J, Lan T, Zhang W, Dong L, Kang N, Zhang S, et al. Feed-forward reciprocal activation of PAFR and STAT3 regulates epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. Cancer Res. 2015;75(19):4198-210.

125. Zhao D, Zhang J, Zhang L, Wu Q, Wang Y, Zhang W, et al. PAFR/Stat3 axis maintains the symbiotic ecosystem between tumor and stroma to facilitate tumor malignancy. Acta Pharm Sin B. 2023;13(2):694-708.

126. Bernstein DL, Jiang X, Rom S. let-7 microRNAs: their role in cerebral and cardiovascular diseases, inflammation, cancer, and their regulation. Biomedicines. 2021;9(6):606.

127. Alshahrani SH, Yuliastanti T, Al-Dolaimy F, Korotkova NL, Rasulova I, Almuala AF, et al. A glimpse into let-7e roles in human disorders; friend or foe? Pathol Res Pract. 2024;253:154992.

128. Lin Z, Ge J, Wang Z, Ren J, Wang X, Xiong H, et al. Let-7e modulates the inflammatory response in vascular endothelial cells through ceRNA crosstalk. Sci Rep. 2017;7(1):42498.

129. Xu J, Lv H, Zhang B, Xu F, Zhu H, Chen B, et al. miR-30b-5p acts as a tumor suppressor microRNA in esophageal squamous cell carcinoma. J Thorac Dis. 2019;11(7):3015-29.

130. Qin X, Chen J, Wu L, Liu Z. MiR-30b-5p acts as a tumor suppressor, repressing cell proliferation and cell cycle in human hepatocellular carcinoma. Biomed Pharmacother. 2017;89:742-50.

131. Liu W, Li H, Wang Y, Zhao X, Guo Y, Jin J, et al. MiR-30b-5p functions as a tumor suppressor in cell proliferation, metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition by targeting G-protein subunit α-13 in renal cell carcinoma. Gene. 2017;626:275-81.

132. Ma T, Zhao Y, Lu Q, Lu Y, Liu Z, Xue T, et al. MicroRNA-30c functions as a tumor suppressor via targeting SNAI1 in esophageal squamous cell carcinoma. Biomed Pharmacother. 2018;98:680-6. Erratum in: Biomed Pharmacother. 2024;179:117376.

133. Shi H, Pan B, Liang J, Cai B, Wu G, Bian Y, et al. miR-30c-5p inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression by repressing the PI3K/AKT signaling pathway. Thorac Cancer. 2024;15(30):2206-16.

134. Hu S, Liu H, Zhang J, Li S, Zhou H, Gao Y. Effects and prognostic values of miR-30c-5p target genes in gastric cancer via a comprehensive analysis using bioinformatics. Sci Rep. 2021;11(1):20584.

135. Maharati A, Moghbeli M. Role of microRNA-505 during tumor progression and metastasis. Pathol Res Pract. 2024;258:155344.

136. Cui T, Bell EH, McElroy J, Becker AP, Gulati PM, Geurts M, et al. miR-4516 predicts poor prognosis and functions as a novel oncogene via targeting PTPN14 in human glioblastoma. Oncogene. 2019;38(16):2923-36.

137. Izadifard M, Ahmadvand M, Chahardouli B, Vaezi M, Janbabai G, Seghatoleslami G, et al. Plasma-circulating miR-638, miR-6511b-5p, miR-3613-5p, miR-455-3p, miR-5787, and miR-548a-3p as noninvasive biomarkers of immune reconstitution post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia patients. Transpl Immunol. 2025;91:102240.

138. Massini G, Siemer D, Hohaus S. EBV in Hodgkin lymphoma. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2009;1(2):e2009013.

139. Volaric AK, Barrantes-Reynolds R, Sahakyan K, Fedoriw Y, Frietze S. The EBV-positive tumor methylome is distinct from EBV-negative in diffuse large B-cell lymphoma. Cancers (Basel). 2025;17(18):2994.

140. Dhiab MB, Ziadi S, Mestiri S, Gacem RB, Ksiaa F, Trimeche M. DNA methylation patterns in EBV-positive and EBV-negative Hodgkin lymphomas. Cell Oncol (Dordr). 2015;38(6):453-62.

141. Notarte KI, Senanayake S, Macaranas I, Albano PM, Mundo L, Fennell E, et al. MicroRNA and other non-coding RNAs in Epstein-Barr virus-associated cancers. Cancers (Basel). 2021;13(15):3909.

142. Vento-Tormo R, Rodríguez-Ubreva J, Lisio LD, Islam AB, Urquiza JM, Hernando H, et al. NF-κB directly mediates epigenetic deregulation of common microRNAs in Epstein-Barr virus-mediated transformation of B-cells and in lymphomas. Nucleic Acids Res. 2014;42(17):11025-39.

143. Ma J, Nie K, Redmond D, Liu Y, Elemento O, Knowles DM, et al. EBV-miR-BHRF1-2 targets PRDM1/Blimp1: potential role in EBV lymphomagenesis. Leukemia. 2016;30(3):594-604.

144. Mrázek J, Kreutmayer SB, Grässer FA, Polacek N, Hüttenhofer A. Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells. Nucleic Acids Res. 2007;35(10):e73.

145. Linnstaedt SD, Gottwein E, Skalsky RL, Luftig MA, Cullen BR. Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus. J Virol. 2010;84(22):11670-8.

146. Wood CD, Carvell T, Gunnell A, Ojeniyi OO, Osborne C, West MJ. Enhancer control of microRNA miR-155 expression in Epstein-Barr virus-infected B cells. J Virol. 2018;92(19):e00716-18. Erratum in: J Virol. 2019;93(3):e01893-18.

147. Beheshti A, Vanderburg C, McDonald JT, Ramkumar C, Kadungure T, Zhang H, et al. A circulating microRNA signature predicts age-based development of lymphoma. PLoS One. 2017;12(1):e0170521.

148. Beheshti A, Stevenson K, Vanderburg C, Ravi D, McDonald JT, Christie AL, et al. Identification of circulating serum multi-MicroRNA signatures in human DLBCL models. Sci Rep. 2019;9(1):17161.

149. Rinaldi F, Marchesi F, Palombi F, Pelosi A, Di Pace AL, Sacconi A, et al. MiR-22, a serum predictor of poor outcome and therapy response in diffuse large B-cell lymphoma patients. Br J Haematol. 2021;195(3):399-404.

150. Marchesi F, Regazzo G, Palombi F, Terrenato I, Sacconi A, Spagnuolo M, et al. Serum miR-22 as potential non-invasive predictor of poor clinical outcome in newly diagnosed, uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma: an explorative pilot study. J Exp Clin Cancer Res. 2018;37(1):95.

151. Khare D, Goldschmidt N, Bardugo A, Gur-Wahnon D, Ben-Dov IZ, Avni B. Plasma microRNA profiling: exploring better biomarkers for lymphoma surveillance. PLoS One. 2017;12(11):e0187722.

152. Kimura K, Hohjoh H, Fukuoka M, Sato W, Oki S, Tomi C, et al. Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis. Nat Commun. 2018;9(1):17.

153. Hatiboglu MA, Karacam B, Khan I, Akdur K, Elbasan EB, Mahfooz S, et al. Liquid biopsy for CNS lymphoma: CSF exosomes and CSF exosomal miR-15a, miR-21, miR-155, miR-210, and miR-19b are promising biomarkers for diagnosis. Mol Biol Rep. 2024;51(1):1035.

154. Orzan RI, Țigu AB, Nechita VI, Nistor M, Agoston R, Gonciar D, et al. Circulating miR-18a and miR-532 levels in extrahepatic cholangiocarcinoma. J Clin Med. 2024;13(20):6177.

155. Liu J, Han Y, Hu S, Cai Y, Yang J, Ren S, et al. Circulating exosomal MiR-107 restrains tumorigenesis in diffuse large B-cell lymphoma by targeting 14-3-3η. Front Cell Dev Biol. 2021;9:667800.

156. Huang X, Gui A, Zhou Y, Xia Z, Liu W, Zuo J, et al. Serum miR-146a level is a potential biomarker in predicting the outcome of diffuse large B-cell lymphoma. Asia Pac J Clin Oncol. 2023;19(5):e283-90.

157. Zare N, Eskandari N, Mehrzad V, Javanmard SH. The expression level of hsa-miR-146a-5p in plasma-derived exosomes of patients with diffuse large B-cell lymphoma. J Res Med Sci. 2019;24:10.

158. Zou CD, Zhao WM, Wang XN, Li Q, Huang H, Cheng WP, et al. MicroRNA-107: a novel promoter of tumor progression that targets the CPEB3/EGFR axis in human hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 2016;7(1):266-78.

159. Liang Y, Zhu D, Hou L, Wang Y, Huang X, Zhou C, et al. MiR-107 confers chemoresistance to colorectal cancer by targeting calcium-binding protein 39. Br J Cancer. 2020;122(5):705-14.

160. Puente-Rivera J, De la Rosa Pérez DA, Olvera SI, Figueroa-Angulo EE, Saucedo JG, Hernández-León O, et al. The circulating miR-107 as a potential biomarker up-regulated in castration-resistant prostate cancer. Noncoding RNA. 2024;10(5):47.

161. Krug AK, Enderle D, Karlovich C, Priewasser T, Bentink S, Spiel A, et al. Improved EGFR mutation detection using combined exosomal RNA and circulating tumor DNA in NSCLC patient plasma. Ann Oncol. 2018;29(3):700-6.

162. Yang Z, LaRiviere MJ, Ko J, Till JE, Christensen T, Yee SS, et al. A multianalyte panel consisting of extracellular vesicle miRNAs and mRNAs, cfDNA, and CA19-9 shows utility for diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2020;26(13):3248-58.

163. Keup C, Suryaprakash V, Hauch S, Storbeck M, Hahn P, Sprenger-Haussels M, et al. Integrative statistical analyses of multiple liquid biopsy analytes in metastatic breast cancer. Genome Med. 2021;13(1):85.

164. Metwally AM, Kasem AAHM, Youssif MI, Hassan SM, Abdel Wahab AHA, Refaat LA. Lymphocyte to monocyte ratio predicts survival and is epigenetically linked to miR-222-3p and miR-26b-5p in diffuse large B-cell lymphoma. Sci Rep. 2023;13(1):4899.

165. Bouvy C, Wannez A, George F, Graux C, Chatelain C, Dogné JM. Circulating microRNAs as biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a pilot prospective longitudinal clinical study. Biomark Cancer. 2018;10:1179299X18781095.

166. Jørgensen S, Paulsen IW, Hansen JW, Tholstrup D, Hother C, Sørensen E, et al. The value of circulating microRNAs for early diagnosis of B-cell lymphoma: a case-control study on historical samples. Sci Rep. 2020;10(1):9637.

167. Cao D, Cao X, Jiang Y, Xu J, Zheng Y, Kang D, et al. Circulating exosomal microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Hematol Oncol. 2022;40(2):172-80.

168. Huo F, Zhang Q, Hu C, Chai F. Association between microRNA-451a expression in serum and survival and prognosis in patients with Hodgkin's lymphoma. Medicine (Baltimore). 2025;104(14):e32587.

169. Zhang HL, Uticul A, Xu XW, Shi YW. [Correlation between serum miR-34a level and thrombocytopenia after chemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2022;30(3):784-89. Chinese.

170. Mu YP, Li XY. Expression of serum miR-21 and miR-155 in patients with diffuse large B-cell lymphoma and their relationship with prognosis. Chin J Cancer Prev Treat. 2022;29(10):731-5.

171. Ge TT, Liang Y, Fu R, Wang GJ, Ruan EB, Qu W, et al. [Expressions of miR-21, miR-155 and miR-210 in plasma of patients with lymphoma and its clinical significance]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2012;20(2):305-9. Chinese.

172. Krsmanovic P, Mocikova H, Chramostova K, Klanova M, Trnkova M, Pesta M, et al. Circulating microRNAs in cerebrospinal fluid and plasma as a sensitive tool for detection of secondary CNS involvement in aggressive non-Hodgkin lymphoma. Cancer (Basel). 2022;14(9):2305.

173. Paszkiewicz-Kozik E, Paziewska A, Kulecka M, Dąbrowska M, Kluska A, Bałabas A, Piątkowska M, et al. Peripheral blood cells from patients with Hodgkin's and diffuse large B-cell lymphomas may be a better source of candidate diagnostic mirnas than circulating miRNAs. Biomed Res Int. 2021;2021:3212878.

174. Caner V, Cetin GO, Hacioglu S, Baris IC, Tepeli E, Turk NS, et al. The miRNA content of circulating exosomes in DLBCL patients and in vitro influence of DLBCL-derived exosomes on miRNA expression of healthy B-cells from peripheral blood. Cancer Biomark. 2021;32(4):519-29.

175. Fajardo-Ramirez OR, Villela L, Campa-Carranza JN, Perez-Maya AA, Borrego-Soto G, Wah-Suarez MI, et al. miRNA signature associated with R-CHOP refractoriness in patients diagnosed with diffuse large B-cell lymphoma. Noncoding RNA Res. 2020;5(4):185-90.

176. Tuncer SB, Akdeniz D, Celik B, Kilic S, Sukruoglu O, Avsar M, et al. The expression levels of miRNA-15a and miRNA-16-1 in circulating tumor cells of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Mol Biol Rep. 2019;46(1):975-80.

177. Xiao XB, Gu Y, Sun DL, Ding LY, Yuan XG, Jiang HW, Wu ZX. Effect of rituximab combined with chemotherapy on the expression of serum exosome miR-451a in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23(4):1620-5.

178. Feng Y, Zhong M, Zeng S, Wang L, Liu P, Xiao X, et al. Exosome-derived miRNAs as predictive biomarkers for diffuse large B-cell lymphoma chemotherapy resistance. Epigenomics. 2019;11(1):35-51.

179. Cao D, Jiang Y, Feng Y, Jing CX, Xu J, Xu CG. [The value of circulating exsomal miR-451a to monitor therapy response in diffuse large B-cell lymphoma]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2018;49(3):399-403. Chinese.

180. Meng Y, Quan L, Liu A. Identification of key microRNAs associated with diffuse large B-cell lymphoma by analyzing serum microRNA expressions. Gene. 2018;642:205-211.

181. Yuan WX, Gui YX, Na WN, Chao J, Yang X. Circulating microRNA-125b and microRNA-130a expression profiles predict chemoresistance to R-CHOP in diffuse large B-cell lymphoma patients. Oncol Lett. 2016;11(1):423-32.

182. Drees EE, Driessen J, Zwezerijnen GJ, Verkuijlen SA, Eertink JJ, van Eijndhoven MA, et al. Blood-circulating EV-miRNAs, serum TARC, and quantitative FDG-PET features in classical Hodgkin lymphoma. EJHaem. 2022;3(3):908-12.

183. van Eijndhoven MA, Zijlstra JM, Groenewegen NJ, Drees EE, van Niele S, Baglio SR, et al. Plasma vesicle miRNAs for therapy response monitoring in Hodgkin lymphoma patients. JCI Insight. 2016;1(19):e89631.

184. Wang Y, Guo D, Li B, Wang Y, Wang B, Wang Z, et al. MiR-665 suppresses the progression of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) through targeting LIM and SH3 protein 1 (LASP1). Leuk Res. 2022;112:106769.

Abstract

Introduction: Hodgkin lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma exhibit clinical and molecular heterogeneity, with limitations in prognostic stratification and therapeutic monitoring. Liquid biopsy has emerged as a promising approach, enabling minimally invasive assessment of circulating biomarkers, such as microRNAs and tumor-educated platelets, which can reflect tumorigenesis-related alterations and disease progression in real time. **Purpose:** To investigate the biomarker potential of platelet-derived mRNA expression and circulating plasma microRNAs in Hodgkin lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. **Methods:** Peripheral blood samples were collected from patients at diagnosis and after treatment, following confirmation of complete remission. Platelet isolation and plasma separation were performed for subsequent total RNA extraction. Gene expression and circulating microRNA analyses were conducted using microarray techniques. Functional interpretation included gene ontology and pathway analyses (GO/KEGG), as well as target prediction (DIANA-miRPath, miRWalk). **Results:** The analyses revealed distinct molecular profiles between Hodgkin lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. Circulating microRNA profiles discriminated pre- and post-treatment samples, disease stages, and clinical outcomes. Integration with the literature reinforced the biomarker potential of these microRNAs. In Hodgkin lymphoma, a panel of nine microRNAs (miR-146a, miR-27a, miR-22, miR-20a, let-7i, let-7a, miR-93, miR-140, miR-15a) showed increased expression at diagnosis. Consistently, microRNAs previously reported as overexpressed in lymphomas exhibited higher levels in advanced stages in both subtypes. In diffuse large B-cell lymphoma, miR-15a and miR-532 were associated with unfavorable outcomes. **Conclusions:** Circulating microRNAs and platelet-derived mRNAs reflect the pathophysiological state of the disease. These biomarkers show potential to complement diagnosis, prognosis, and disease monitoring in lymphomas, although further validation in larger cohorts is required.

Keywords: Hodgkin disease; Lymphoma, large B-cell, diffuse; Liquid biopsy; Circulating microRNA; Tumor-educated platelets

Apêndice

Apêndice 1. Revisão da literatura de estudos que identificaram microRNAs em biópsia líquida em linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B

miRNAs avaliados	Tipo de linfoma	Componente biológico	Técnica utilizada	Potencial biomarcador	Número amostral e comparações	Estudo
miR-222-3p; miR-26b-5p; EBV-miR-BHRF1-2-5p; EBV-miR-BHRF1-2-3p	LDGCB	Soro	qRT-PCR	Diagnóstico	40 pacientes *versus* 18 controles saudáveis	Metwally et al.[164]
miR-146a-5p	LDGCB	Vesículas extracelulares derivadas do plasma	qRT-PCR	Resposta; prognóstico	17 pacientes responsivos *versus* 16 pacientes refratários *versus* pacientes em tratamento com R-CHOP *versus* 6 controles saudáveis	Zare et al.[157]
miR-127-3p; miR-155-5p; miR-21-5p; miR-24-3p; let-7a-5p	LH	Vesículas extracelulares derivadas do plasma	RNAseq; qPCR	Diagnóstico prognóstico e resposta	31 pacientes e 19 controles saudáveis Antes do tratamento *versus* após o tratamento; resposta completa *versus* resposta parcial; pacientes antes do tratamento *versus* controles saudáveis *versus* resposta completa	Drees et al.[52]
miR-494; miR-1973; miR-21; miR-155; miR-16	LH	Plasma	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico; resposta	42 pacientes *versus* 20 controles saudáveis; pacientes antes do tratamento *versus* durante o tratamento *versus* após o tratamento	Jones et al.[53]
miR-20a; miR-21; miR-16	LH	Vesículas extracelulares derivadas do plasma	qRT-PCR	Diagnóstico; resposta	37 pacientes *versus* 74 livres de câncer; 18 pacientes antes do tratamento *versus* após o tratamento	Hernández-Walias et al.[42]
miR-19b; miR-20a; miR-451; miR-21; miR-197	LDGCB	Plasma	*Microarray*	Resposta	19 pacientes antes do tratamento *versus* durante o tratamento *versus* após o tratamento	Bouvy et al.[165]

continua...

...continuação

miR-326; miR-375; miR-21-5p	LDGCB	Plasma	qRT-PCR	Diagnóstico	16 pacientes *versus* 13 controles saudáveis;14 pacientes *versus* controles saudáveis	Jørgensen et al.[166]
miR-379-5p; miR-135a-3p; miR-4476; miR-451a; miR-483-3p	LDGCB	Vesículas extracelulares derivadas do soro	*Microarray*; qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico	133 pacientes *versus* 94 controles saudáveis	Cao et al.[167]
miR-451a	LH	Soro	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico	164 pacientes *versus* 164 controles saudáveis; alta expressão *versus* baixa expressão	Huo et al.[168]
miR-146a	LDGCB	Soro	qRT-PCR	Resposta; prognóstico	72 pacientes antes do tratamento *versus* após o tratamento	Huang et al.[156]
miR-34a	LDGCB	Soro		Prognóstico	69 pacientes antes do tratamento *versus* após o tratamento	Zhang et al.[169]
miR-21	LDGCB	Soro	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico	176 pacientes *versus* 52 controles saudáveis; alta expressão *versus* baixa expressão	Ji et al.[43]
miR-21; miR-155	LDGCB	Soro	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico	38 pacientes *versus* 38 controles saudáveis	Mu et al.[170]
miR-21; miR-155; miR-210	Linfoma	Soro	qRT-PCR	Diagnóstico; resposta	54 pacientes *versus* 27 controles saudáveis; pacientes antes do tratamento *versus* após o tratamento	Ge et al.[171]
miR-19a; miR-20a; miR-21; miR-92a; miR-155	LNH de células B agressivos	Plasma; líquido cefalorraquidiano	qRT-PCR	Resposta; prognóstico	162 pacientes antes do tratamento *versus* durante o tratamento *versus* recidiva em SNC	Krsmanovic et al.[172]
miR-150; miR-21	LDGCB	Soro	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico	50 pacientes *versus* 50 controles saudáveis; estágio IV *versus* estágio II	Abou Elnour et al.[44]

continua...

...continuação

miR-22	LDGCB	Soro; vesículas extracelulares derivadas do soro	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico; resposta	78 pacientes *versus* 10 controles saudáveis	Rinaldi et al.[149]
miR-21	LDGCB	Plasma	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico; resposta	53 pacientes *versus* controles saudáveis	Asker et al.[45]
miR-107; miR-375-3p; miR-485-3p	LDGCB	Vesículas extracelulares derivadas do plasma	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico	42 pacientes *versus* 31 controles saudáveis	Liu et al.[155]
miR21; miR130b; miR155; miR28	LDGCB	Soro	*Microarray*; qRT-PCR	Prognóstico	524 pacientes; diagnóstico *versus* remissão completa; remissão completa *versus* recaída	Sun et al.[49]
Diversos	LH e LDGCB	Soro	Sequenciamento de nova geração	Diagnóstico; resposta	20 pacientes LH antes do tratamento *versus* 18 pacientes após o tratamento; 21 pacientes LDGCB antes do tratamento *versus* 17 pacientes após o tratamento; todos também foram comparados com 30 controles saudáveis	Paszkiewicz-Kozik et al.[173]
Diversos	LH e LDGCB	Células do sangue periférico	Sequenciamento de nova geração	Diagnóstico; resposta	21 pacientes LH antes do tratamento *versus* 8 pacientes após o tratamento; 17 pacientes LDGCB antes do tratamento *versus* 9 pacientes após o tratamento; todos também foram comparados com 30 controles saudáveis	Paszkiewicz-Kozik et al.[173]
miR-3960; miR-6089; miR-939-5p	LDGCB	Vesículas extracelulares derivadas do plasma	*Microarray*	Diagnóstico	20 pacientes *versus* 20 controles saudáveis	Caner et al.[174]

continua...

...continuação

miR-105-5p; miR-186-5p; miR-19a-3p; miR-572; miR-1267; miR-555; miR-205-5p; miR-490-5p; miR-520d-3p; miR-100-5p; miR-1910-5p; miR-24-3p; miR-628-3p; miR-766-3p; miR-615-3p	LDGCB	Plasma	*Microarray*	Resposta	12 pacientes responsivos (remissão completa) *versus* 4 pacientes com resposta parcial/refratários	Fajardo-Ramirez et al.[175]
miR-155; let-7g; let-7i	LDGCB	Vesículas extracelulares derivadas do plasma	qRT-PCR	Resposta; prognóstico	16 pacientes refratários *versus* 17 pacientes responsivos *versus* 15 pacientes em tratamento *versus* 6 controles saudáveis	Zare et al.[51]
miRNA-15a; miRNA-16-1	LDGCB	Células do sangue periférico	qRT-PCR	Diagnóstico	40 pacientes *versus* 15 controles saudáveis	Tuncer et al.[176]
miR-451a	LDGCB	Vesículas extracelulares derivadas do soro	qRT-PCR	Diagnóstico; resposta	89 pacientes *versus* 48 controles saudáveis; pacientes antes do tratamento *versus* após o tratamento	Xiao et al.[177]
miR-99a-5p; miR-125b-5p	LDGCB	Plasma	qRT-PCR	Resposta; prognóstico	83 pacientes quimiossensíveis *versus* 33 pacientes quimioresistentes; resposta completa *versus* resposta parcial; doença estável *versus* doença progressiva	Feng et al.[178]
miR-494; miR-21	LDGCB	Plasma; nanopartículas plasmáticas	qRT-PCR	Resposta	Plasma: 22 pacientes *versus* 13 controles saudáveis; 35 pacientes responsivos *versus* 21 pacientes refratários; 56 pacientes antes do tratamento *versus* após o tratamento; 8 pacientes *versus* 10 controles saudáveis. Nanopartículas: 10 pacientes versus 10 controles saudáveis	Cui et al.[46]
miR-155	LDGCB	Plasma	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico	40 pacientes *versus* 38 controles saudáveis	Ahmadvand et al.[50]
miR-22	LDGCB	Soro	*Microarray*; qRT-PCR	Prognóstico	36 pacientes antes do tratamento *versus* após o tratamento; pacientes *versus* controles saudáveis	Marchesi et al.[150]

continua...

...continuação

miR-451a	LDGCB	Vesículas extracelulares derivadas do soro	qRT-PCR	Diagnóstico; resposta	56 pacientes *versus* 56 controles saudáveis; pacientes antes do tratamento *versus* durante o tratamento *versus* após o tratamento	Cao et al.[179]
miR-34a-5p; miR-323b-3p; miR-431-5p	LDGCB	Soro	Sequenciamento de alto rendimento; qRT-PCR	Diagnóstico	Seq: 3 pacientes *versus* 3 controles saudáveis; qRT-PCR: 6 pacientes *versus* 6 controles saudáveis	Meng et al.[180]
miR-124; miR-532-5p, miR-425; miR-141; miR-145; miR-197; miR-345; miR-424; miR-128; miR-122; miR-20b; miR-20a; miR-106b; miR-106a	LDGCB	Plasma	Sequenciamento	Diagnóstico; prognóstico	14 pacientes *versus* 20 controles saudáveis	Khare et al.[151]
miR-25; miR-30a/d; miR-26b; miR-182; miR-186; miR-140*; miR-125a; miR-23a; miR-122; miR-93; miR-144; miR-20b; miR-20a; miR-106b; miR-106a; miR-423	LH	Plasma	Sequenciamento	Diagnóstico; prognóstico	11 pacientes *versus* 20 controles saudáveis	Khare et al.[151]
miR-125b; miR-130a	LDGCB	Soro	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico; resposta	56 pacientes *versus* 20 controles saudáveis	Yuan et al.[181]
miR-21	LDGCB	Soro	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico	112 pacientes *versus* 45 controles saudáveis	Li et al.[47]
let-7b; let-7c; miR-18a; miR-24; miR-15a; miR-27a; miR-130a; miR-155	LDGCB	Soro	qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico; resposta	86 pacientes *versus* 17 controles saudáveis; pré-tratamento *versus* pacientes em tratamento *versus* pós-tratamento *versus* controles saudáveis	Beheshti et al.[148]
miR-191; miR-21	LDGCB	Soro	qRT-PCR	Prognóstico	15 pacientes em estágio I *versus* 25 no estágio II *versus* 37 no estágio III *versus* 23 no estágio IV	Ren et al.[48]

continua...

...continuação

miR-122-5p	LH	Vesículas extracelulares derivadas do plasma	Sequenciamento; qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico	86 pacientes *versus* 27 controles saudáveis; remissão completa *versus* recaída	Salzmann et al.[54]
miR127-3p; miR24-3p	LH	Vesículas extracelulares derivadas do plasma	qRT-PCR	Resposta; prognóstico	17 pacientes recém-diagnosticados *versus* 13 pacientes com recidiva/refratários	Drees et al.[182]
miR-155	LH	Sangue periférico total	qRT-PCR	Diagnóstico	61 pacientes *versus* 36 controles saudáveis; EBV positivo *versus* EBV negativo	Altamemi et al.[55]
miR-24-3p; miR-127-3p; miR21-5p; miR-155-5p; let7a-5p	LH	Vesículas extracelulares derivadas do plasma	Sequenciamento; qRT-PCR	Diagnóstico; prognóstico; resposta	20 pacientes *versus* 9 controles saudáveis	van Eijndhoven et al.[183]
miR-665	LDGCB	Vesículas extracelulares derivadas do soro	qRT-PCR	Diagnóstico	30 pacientes *versus* 30 controles saudáveis	Wang et al.[184]

Apêndice 2. Relação completa de microRNAs diferencialmente expressos antes e depois do tratamento no linfoma de Hodgkin

miRNA	log_2FC (F0/F1)	Valor-p	miRNA	log_2FC (F0/F1)	Valor-p
hsa-miR-151a-5p	8,99	0,0016	hsa-miR-339-5p	2,76	0,0141
hsa-miR-146a-5p	8,34	0,002	hsa-miR-425-3p	2,64	0,0006
hsa-miR-23b-3p	7,9	0,0006	hsa-mir-139	2,59	0,0152
hsa-miR-15b-5p	7,88	0,0076	hsa-miR-766-3p	2,52	0,0068
hsa-miR-199a-3p	7,73	0,0006	hsa-miR-134-5p	2,4	0,0011
hsa-miR-199b-3p	7,73	0,0006	hsa-miR-664a-5p	2,33	0,0029
hsa-miR-27a-3p	7,71	0,0013	hsa-miR-433-3p	2,32	0,0019
hsa-let-7e-5p	7,38	0,0017	hsa-miR-93-3p	2,23	0,0262
hsa-miR-22-3p	7,33	0,003	hsa-miR-431-5p	2,15	0,0024
hsa-miR-425-5p	7,29	0,0037	hsa-miR-7975	2,14	0,0076
hsa-let-7g-5p	7,25	0,0041	hsa-miR-766-5p	2,13	0,0047
hsa-miR-151a-3p	7,22	0,0017	hsa-miR-6852-5p	2,09	0,0066
hsa-miR-20b-5p	7,21	0,0063	hsa-miR-345-5p	2,08	0,0392
hsa-miR-223-3p	7,11	0,0014	hsa-miR-7977	2	0,0006
hsa-miR-652-3p	6,99	0,001	hsa-miR-181d-5p	1,99	0,0074
hsa-miR-361-5p	6,94	0,0007	hsa-miR-4484	1,85	0,0194
hsa-let-7f-5p	6,92	0,0017	hsa-miR-1273h-5p	1,79	0,0027
hsa-miR-222-3p	6,9	0,0002	hsa-miR-1273g-3p	1,74	0,0053
hsa-miR-24-3p	6,87	0,0022	hsa-miR-6742-5p	1,7	0,0063
hsa-miR-221-3p	6,74	0,0003	hsa-miR-1909-3p	1,69	0,0324
hsa-miR-18a-5p	6,73	0,0029	hsa-miR-485-3p	1,68	0,0005
hsa-miR-27b-3p	6,62	0,0009	hsa-miR-23a-5p	1,64	0,0139
hsa-miR-423-3p	6,59	0,0000933	hsa-miR-493-3p	1,6	0,0012
hsa-miR-584-5p	6,54	0,0008	hsa-miR-1273h-3p	1,59	0,0071
hsa-miR-151b	6,53	0,0027	hsa-miR-543	1,58	0,0118
hsa-miR-107	6,45	0,0019	hsa-mir-4485	1,57	0,0024
hsa-miR-342-3p	6,42	0,0014	hsa-miR-4433-3p	1,53	0,0185
hsa-miR-106a-5p	6,39	0,0057	hsa-miR-409-5p	1,5	0,0032
hsa-miR-191-5p	6,35	0,0011	hsa-miR-1229-5p	1,48	0,0131
hsa-miR-17-5p	6,34	0,0068	hsa-miR-24-2-5p	1,48	0,0394
hsa-miR-19b-3p	6,27	0,0223	hsa-miR-1260b	1,32	0,0037
hsa-miR-126-3p	6,2	0,0016	hsa-miR-337-5p	1,28	0,0387
hsa-let-7d-5p	6,17	0,0058	hsa-miR-370-3p	1,24	0,0335
hsa-miR-93-5p	6,16	0,0058	hsa-miR-17-3p	1,21	0,0261
hsa-miR-103a-3p	6,15	0,0015	hsa-mir-92b	1,2	0,0088
hsa-let-7i-5p	6,02	0,005	hsa-miR-424-3p	1,19	0,0099
hsa-miR-432-5p	6	0,0003	hsa-mir-4284	1,19	0,0004
hsa-miR-26a-5p	5,96	0,006	hsa-miR-485-5p	1,16	0,0035
hsa-let-7a-5p	5,88	0,0036	hsa-miR-125b-5p	1,15	0,0497
hsa-miR-181a-5p	5,87	0,0000615	hsa-miR-30b-3p	1,12	0,0371
hsa-miR-125a-5p	5,83	0,0082	hsa-miR-4286	1,09	0,0204
hsa-miR-139-5p	5,83	0,0005	hsa-miR-6891-5p	1,03	0,0212
hsa-miR-15a-5p	5,81	0,0166	hsa-miR-326	1,03	0,0194
hsa-miR-25-3p	5,78	0,0487	hsa-miR-487a-3p	1,01	0,0085
hsa-miR-140-3p	5,74	0,0346	hsa-miR-6723-5p	1	0,0044
hsa-miR-130b-3p	5,73	0,0064	hsa-miR-1972	0,99	0,0192
hsa-miR-30d-5p	5,72	0,0058	hsa-miR-6819-5p	0,98	0,0029
hsa-miR-23a-3p	5,7	0,0063	hsa-miR-181a-2-3p	0,95	0,0404
hsa-miR-20a-5p	5,67	0,0092	hsa-miR-27b-5p	0,95	0,0114

continua...

...continuação

hsa-miR-145-5p	5,63	0,0003	hsa-miR-6754-5p	0,88	0,0153
hsa-miR-625-5p	5,36	0,0000392	hsa-miR-3197	0,84	0,0323
hsa-miR-409-3p	5,29	0,0000213	hsa-miR-1271-5p	0,84	0,0139
hsa-miR-21-5p	5,19	0,0021	hsa-miR-376a-3p	0,83	0,0075
hsa-miR-30c-5p	5,18	0,0027	hsa-miR-7847-3p	0,83	0,0229
hsa-miR-28-5p	5,12	0,0003	hsa-miR-6765-3p	0,81	0,0284
hsa-miR-28-3p	5,06	0,0002	hsa-miR-185-3p	0,74	0,0465
hsa-miR-152-3p	5,03	0,0007	hsa-mir-423	0,73	0,0132
hsa-miR-1246	5,01	0,034	hsa-miR-4461	0,72	0,0126
hsa-miR-486-3p	4,91	0,0283	hsa-miR-654-5p	0,71	0,0405
hsa-miR-155-5p	4,86	0,0002	hsa-mir-28	0,7	0,0033
hsa-miR-130a-3p	4,84	0,0006	hsa-mir-6765	0,67	0,0123
hsa-miR-1301-3p	4,77	0,0012	hsa-miR-1231	0,64	0,0078
hsa-miR-7641	4,77	0,0053	hsa-mir-425	0,64	0,0314
hsa-miR-200c-3p	4,71	0,0002	hsa-miR-642a-3p	0,64	0,0084
hsa-miR-99b-5p	4,68	0,0027	hsa-miR-654-3p	0,64	0,0165
hsa-miR-199a-5p	4,6	0,0016	hsa-mir-1299	0,63	0,0444
hsa-miR-106b-5p	4,57	0,007	hsa-miR-18a-3p	0,62	0,0335
hsa-miR-382-5p	4,56	0,0000647	hsa-mir-22	0,62	0,0061
hsa-miR-181b-5p	4,44	0,0001	hsa-mir-1301	0,62	0,0248
hsa-miR-484	4,42	0,0005	hsa-mir-1973	0,61	0,0034
hsa-mir-361	4,4	0,0005	hsa-miR-4667-5p	0,6	0,0234
hsa-miR-744-5p	4,4	0,0023	hsa-mir-6723	0,6	0,0079
hsa-miR-127-3p	4,36	0,001	hsa-miR-10a-5p	0,59	0,0403
hsa-miR-185-5p	4,35	0,0215	hsa-miR-505-3p	0,58	0,0472
hsa-miR-106b-3p	4,28	0,0127	hsa-miR-6836-3p	-0,59	0,0238
hsa-miR-146b-5p	4,23	0,0036	hsa-miR-6748-3p	-0,66	0,0065
hsa-miR-421	4,22	0,0055	hsa-mir-4722	-0,75	0,0054
hsa-miR-18b-5p	4,16	0,0081	hsa-miR-602	-0,83	0,0006
hsa-miR-378a-3p	4,16	0,0452	hsa-mir-7108	-0,86	0,0224
hsa-miR-324-5p	4,07	0,0019	hsa-miR-668-5p	-0,95	0,0434
hsa-miR-29a-3p	3,99	0,0081	hsa-miR-585-5p	-1,02	0,0491
hsa-miR-330-3p	3,95	0,001	hsa-miR-6865-5p	-1,04	0,0106
hsa-miR-30b-5p	3,94	0,0084	hsa-miR-1469	-1,08	0,0094
hsa-miR-628-3p	3,87	0,007	hsa-mir-4530	-1,1	0,0107
hsa-miR-92b-3p	3,82	0,0016	hsa-mir-550a-1	-1,15	0,0163
hsa-miR-339-3p	3,81	0,0478	hsa-mir-550a-2	-1,15	0,0163
hsa-miR-379-5p	3,75	0,0024	hsa-mir-550a-3	-1,15	0,0163
hsa-mir-484	3,74	0,0007	hsa-miR-638	-1,15	0,037
hsa-miR-1307-3p	3,74	0,0021	hsa-miR-4722-3p	-1,24	0,0324
hsa-miR-505-5p	3,72	0,0072	hsa-miR-4706	-1,32	0,0375
hsa-let-7c-5p	3,69	0,0414	hsa-miR-6794-5p	-1,4	0,0169
hsa-miR-629-5p	3,67	0,0271	hsa-mir-4417	-1,45	0,0201
hsa-miR-494-3p	3,64	0,0048	hsa-miR-6756-5p	-1,54	0,0315
hsa-miR-148b-3p	3,59	0,0174	hsa-miR-2277-5p	-1,61	0,0317
hsa-miR-143-3p	3,56	0,0262	hsa-mir-6763	-1,69	0,0328
hsa-miR-128-3p	3,55	0,0092	hsa-miR-4487	-1,78	0,0269
hsa-miR-4284	3,53	0,0002	hsa-miR-6511b-5p	-1,84	0,0288
hsa-miR-2110	3,51	0,0439	hsa-miR-7151-3p	-1,91	0,047
hsa-miR-1973	3,39	0,0067	hsa-mir-320e	-1,96	0,0105
hsa-miR-487b-3p	3,35	0,0094	hsa-miR-6846-5p	-2,02	0,0165
hsa-miR-328-3p	3,12	0,0068	hsa-miR-6750-5p	-2,05	0,0167
hsa-miR-3135b	3	0,0231	hsa-miR-8075	-2,33	0,014
hsa-miR-197-3p	2,91	0,0007	hsa-mir-6776	-2,33	0,0092
hsa-miR-4454	2,88	0,0073	hsa-mir-6722	-2,45	0,0106

continua...

...continuação

hsa-miR-132-3p	2,87	0,0232	hsa-miR-378h	-2,5	0,008
hsa-miR-92a-3p	2,85	0,0377	hsa-miR-6732-5p	-2,57	0,0083
hsa-miR-210-3p	2,85	0,0402	hsa-miR-20a-3p	-2,65	0,0239
hsa-miR-3615	2,81	0,0019	hsa-miR-4743-5p	-2,69	0,0151
hsa-miR-320e	2,81	0,033	hsa-miR-8055	-2,78	0,0181

Apêndice 3. Relação completa de microRNAs diferencialmente expressos estágios mais avançados no linfoma de Hodgkin

miRNA	log_2FC (III-IV/I-II)	Valor-p	miRNA	log_2FC (III-IV/I-II)	Valor-p
hsa-miR-103a-3p	10,41	0,002	hsa-miR-4459	3,36	0,0126
hsa-miR-191-5p	10,14	0,0038	hsa-miR-4649-5p	3,36	0,0245
hsa-miR-17-5p	10,02	0,0038	hsa-miR-3937	3,34	0,0279
hsa-miR-23a-3p	9,78	0,0213	hsa-miR-4758-5p	3,33	0,0099
hsa-let-7d-5p	9,76	0,0042	hsa-miR-4270	3,31	0,0014
hsa-miR-107	9,71	0,0024	hsa-miR-1233-5p	3,28	0,0025
hsa-miR-106a-5p	9,68	0,0038	hsa-miR-197-3p	3,24	0,0068
hsa-miR-20a-5p	9,51	0,0037	hsa-mir-6089-1	3,22	0,0141
hsa-miR-126-3p	9,31	0,0037	hsa-mir-6089-2	3,22	0,0141
hsa-let-7i-5p	8,95	0,0035	hsa-miR-128-3p	3,17	0,0259
hsa-miR-93-5p	8,86	0,0015	hsa-miR-328-3p	3,15	0,0039
hsa-miR-146a-5p	8,63	0,0026	hsa-miR-6132	3,09	0,0062
hsa-miR-221-3p	8,6	0,0113	hsa-miR-1268a	3,07	0,0112
hsa-miR-23b-3p	8,43	0,0076	hsa-miR-6848-5p	3,04	0,0156
hsa-let-7e-5p	8,26	0,0213	hsa-miR-7977	3,03	0,0091
hsa-miR-106b-5p	8,2	0,008	hsa-miR-210-3p	3,03	0,0476
hsa-miR-27a-3p	8,08	0,0047	hsa-miR-664a-5p	2,96	0,0073
hsa-miR-425-5p	7,99	0,0022	hsa-miR-4284	2,96	0,0000976
hsa-miR-199a-3p	7,97	0,0025	hsa-mir-4281	2,95	0,001
hsa-miR-199b-3p	7,97	0,0025	hsa-miR-1268b	2,92	0,0024
hsa-miR-22-3p	7,86	0,0044	hsa-miR-324-3p	2,89	0,0266
hsa-miR-151a-3p	7,73	0,0164	hsa-miR-7847-3p	2,85	0,0113
hsa-miR-20b-5p	7,72	0,005	hsa-miR-7975	2,82	0,0014
hsa-miR-652-3p	7,51	0,0024	hsa-miR-3615	2,81	0,0233
hsa-miR-222-3p	7,49	0,0032	hsa-miR-6068	2,81	0,0015
hsa-miR-361-5p	7,43	0,0328	hsa-miR-339-5p	2,8	0,0191
hsa-miR-744-5p	7,34	0,0035	hsa-miR-378c	2,78	0,0496
hsa-let-7g-5p	7,34	0,0071	hsa-miR-155-5p	2,76	0,0197
hsa-miR-25-3p	7,34	0,0081	hsa-mir-5095	2,73	0,0097
hsa-miR-27b-3p	7,27	0,0041	hsa-miR-4749-5p	2,72	0,0068
hsa-miR-19b-3p	7,24	0,0056	hsa-miR-342-5p	2,72	0,0196
hsa-miR-18a-5p	7,22	0,0071	hsa-miR-3185	2,7	0,0115
hsa-miR-223-3p	7,17	0,006	hsa-miR-6798-5p	2,67	0,0235
hsa-let-7f-5p	7,03	0,005	hsa-miR-6850-5p	2,67	0,0274
hsa-miR-584-5p	7,02	0,0064	hsa-miR-4530	2,64	0,0001
hsa-miR-15b-5p	6,97	0,0076	hsa-miR-4488	2,61	0,0066
hsa-miR-342-3p	6,65	0,0027	hsa-miR-4433b-3p	2,59	0,0372
hsa-miR-5100	6,63	0,0019	hsa-mir-139	2,57	0,009
hsa-miR-181a-5p	6,61	0,0043	hsa-miR-6813-5p	2,53	0,0139
hsa-miR-423-3p	6,55	0,0022	hsa-miR-324-5p	2,52	0,0179
hsa-miR-451a	6,47	0,0199	hsa-miR-766-5p	2,44	0,0081
hsa-miR-140-3p	6,27	0,0072	hsa-miR-433-3p	2,41	0,0179
hsa-let-7a-5p	6,27	0,0298	hsa-miR-4516	2,39	0,0053
hsa-miR-30d-5p	6,23	0,0032	hsa-miR-345-5p	2,39	0,0348
hsa-miR-151b	6,14	0,0021	hsa-mir-6800	2,39	0,0068
hsa-miR-26a-5p	6,09	0,0122	hsa-miR-3620-5p	2,37	0,0214
hsa-miR-4505	6,05	0,0053	hsa-mir-6800	2,36	0,0078
hsa-miR-139-5p	5,98	0,0026	hsa-miR-195-5p	2,32	0,0317
hsa-miR-125a-5p	5,92	0,0109	hsa-miR-503-5p	2,32	0,0275

continua...

...continuação

hsa-miR-15a-5p	5,91	0,0075	hsa-miR-3180-3p	2,31	0,0365
hsa-miR-3940-5p	5,89	0,018	hsa-miR-6727-5p	2,3	0,0119
hsa-miR-21-5p	5,78	0,0051	hsa-miR-320c	2,29	0,0417
hsa-miR-145-5p	5,77	0,0062	hsa-miR-1273h-5p	2,29	0,0298
hsa-miR-28-5p	5,77	0,002	hsa-miR-6125	2,27	0,0015
hsa-miR-6724-5p	5,7	0,0256	hsa-miR-6803-5p	2,24	0,0051
hsa-miR-625-5p	5,7	0,003	hsa-miR-1587	2,22	0,0311
hsa-miR-7108-5p	5,68	0,0039	hsa-miR-6846-5p	2,21	0,0372
hsa-miR-432-5p	5,65	0,0044	hsa-miR-1273g-3p	2,16	0,0009
hsa-miR-4687-3p	5,64	0,0097	hsa-miR-93-3p	2,16	0,0479
hsa-miR-1246	5,62	0,0259	hsa-miR-4446-3p	2,16	0,0198
hsa-miR-6805-5p	5,54	0,0036	hsa-miR-766-3p	2,14	0,0159
hsa-miR-409-3p	5,53	0,0011	hsa-miR-3196	2,14	0,0128
hsa-miR-486-3p	5,42	0,0126	hsa-miR-4665-5p	2,13	0,0412
hsa-miR-6800-5p	5,42	0,0029	hsa-miR-181d-5p	2,12	0,0082
hsa-miR-382-5p	5,4	0,002	hsa-miR-378i	2,12	0,0441
hsa-miR-6816-5p	5,36	0,0144	hsa-miR-139-3p	2,09	0,0189
hsa-miR-762	5,33	0,0057	hsa-miR-6794-5p	2,08	0,0391
hsa-miR-152-3p	5,26	0,0041	hsa-miR-6778-5p	2,05	0,0102
hsa-miR-4745-5p	5,23	0,0155	hsa-miR-4750-5p	2,04	0,0324
hsa-miR-130a-3p	5,18	0,0056	hsa-miR-3180	2	0,0263
hsa-miR-28-3p	5,17	0,002	hsa-miR-6802-5p	1,97	0,0183
hsa-miR-134-5p	5,13	0,0171	hsa-miR-8069	1,93	0,0224
hsa-miR-1301-3p	5,07	0,0026	hsa-miR-431-5p	1,91	0,0161
hsa-miR-6789-5p	4,93	0,0034	hsa-miR-1225-5p	1,88	0,0202
hsa-miR-619-5p	4,91	0,0309	hsa-miR-6799-5p	1,86	0,0396
hsa-miR-1228-5p	4,87	0,0118	hsa-miR-939-5p	1,84	0,0105
hsa-miR-200c-3p	4,85	0,0033	hsa-miR-6819-5p	1,84	0,0032
hsa-miR-6743-5p	4,84	0,0018	hsa-miR-6852-5p	1,84	0,0283
hsa-miR-143-3p	4,76	0,0379	hsa-miR-2861	1,81	0,0022
hsa-miR-629-5p	4,75	0,0186	hsa-miR-8089	1,78	0,0165
hsa-miR-1207-5p	4,75	0,0175	hsa-miR-1260b	1,77	0,0227
hsa-miR-4734	4,71	0,0047	hsa-miR-6790-5p	1,75	0,005
hsa-miR-4306	4,69	0,0128	hsa-miR-6729-5p	1,68	0,0393
hsa-miR-7641	4,67	0,0033	hsa-miR-370-3p	1,63	0,0318
hsa-miR-484	4,66	0,0062	hsa-miR-6879-5p	1,57	0,0062
hsa-miR-18b-5p	4,64	0,0192	hsa-miR-1973	1,51	0,0396
hsa-miR-6821-5p	4,62	0,0037	hsa-miR-4466	1,44	0,0396
hsa-miR-30c-5p	4,59	0,0065	hsa-miR-5196-5p	1,39	0,0364
hsa-miR-99b-5p	4,58	0,0057	hsa-miR-6127	1,37	0,0473
hsa-miR-181b-5p	4,57	0,0021	hsa-miR-30b-3p	1,34	0,0163
hsa-miR-339-3p	4,54	0,0108	hsa-miR-335-5p	1,32	0,0106
hsa-miR-4467	4,53	0,0004	hsa-miR-4498	1,32	0,0406
hsa-miR-1307-3p	4,51	0,0059	hsa-miR-4710	1,31	0,0321
hsa-miR-4674	4,5	0,0073	hsa-miR-5189-5p	1,28	0,0229
hsa-miR-106b-3p	4,45	0,0141	hsa-mir-423	1,25	0,033
hsa-miR-4763-3p	4,43	0,0005	hsa-miR-1915-3p	1,2	0,0265
hsa-miR-6722-3p	4,41	0,0123	hsa-miR-4298	1,2	0,0494
hsa-miR-663a	4,37	0,0279	hsa-miR-27b-5p	1,18	0,0449
hsa-miR-199a-5p	4,37	0,003	hsa-miR-493-3p	1,17	0,0152
hsa-miR-29a-3p	4,37	0,012	hsa-miR-6820-5p	1,16	0,0029
hsa-miR-1343-5p	4,36	0,0073	hsa-miR-6808-5p	1,14	0,0343
hsa-miR-421	4,36	0,0049	hsa-miR-1231	1,12	0,009
hsa-miR-6858-5p	4,34	0,0089	hsa-mir-320a	1,1	0,0344
hsa-miR-146b-5p	4,31	0,0072	hsa-miR-409-5p	1,07	0,0254

continua...

...continuação

hsa-miR-3135b	4,27	0,0132	hsa-miR-6090	1,06	0,0412
hsa-miR-4492	4,2	0,0000959	hsa-miR-485-3p	1,03	0,0149
hsa-miR-2110	4,18	0,0074	hsa-miR-671-5p	1,02	0,0209
hsa-miR-5001-5p	4,17	0,0134	hsa-miR-6087	1,01	0,0246
hsa-miR-185-5p	4,16	0,0271	hsa-miR-6861-5p	1	0,0178
hsa-miR-6775-5p	4,14	0,0353	hsa-mir-3679	0,99	0,0414
hsa-miR-628-3p	4,08	0,0053	hsa-miR-1185-1-3p	0,97	0,0205
hsa-miR-127-3p	4,06	0,0088	hsa-miR-6795-5p	0,95	0,0064
hsa-miR-574-3p	4,06	0,0093	hsa-miR-376c-3p	0,95	0,0349
hsa-miR-379-5p	4,05	0,0057	hsa-miR-4655-5p	0,93	0,0255
hsa-miR-6752-5p	4,02	0,0066	hsa-miR-485-5p	0,88	0,0148
hsa-miR-149-3p	4,01	0,0000669	hsa-miR-7845-5p	0,88	0,035
hsa-miR-151a-5p	4	0,0006	hsa-miR-654-5p	0,87	0,0285
hsa-miR-16-5p	4	0,0124	hsa-miR-4430	0,81	0,0114
hsa-miR-4739	3,96	0,0081	hsa-mir-6858	0,79	0,0079
hsa-miR-4507	3,91	0,0026	hsa-miR-6869-5p	0,79	0,0377
hsa-miR-1227-5p	3,9	0,0032	hsa-miR-1910-5p	0,74	0,0117
hsa-miR-3621	3,83	0,0041	hsa-miR-487a-3p	0,68	0,0281
hsa-miR-24-3p	3,81	0,0013	hsa-miR-6754-5p	0,69	0,0144
hsa-miR-425-3p	3,75	0,0057	hsa-miR-6765-3p	0,69	0,0427
hsa-miR-4651	3,74	0,0059	hsa-mir-4537	0,68	0,0095
hsa-miR-505-5p	3,75	0,019	hsa-miR-6889-5p	0,68	0,0311
hsa-miR-4632-5p	3,73	0,0132	hsa-mir-4730	0,67	0,0225
hsa-miR-6787-5p	3,71	0,0061	hsa-miR-584-3p	0,67	0,0302
hsa-miR-487b-3p	3,71	0,0118	hsa-mir-628	0,67	0,0427
hsa-miR-3178	3,69	0,0305	hsa-miR-1469	0,65	0,0321
hsa-miR-3141	3,69	0,0101	hsa-miR-6893-5p	0,63	0,0307
hsa-miR-494-3p	3,66	0,0144	hsa-miR-3177-3p	0,62	0,0207
hsa-miR-937-5p	3,65	0,0044	hsa-miR-10a-5p	0,6	0,0365
hsa-miR-330-3p	3,63	0,0016	hsa-miR-642a-3p	0,59	0,0207
hsa-mir-484	3,62	0,0078	hsa-miR-6723-5p	0,58	0,0191
hsa-miR-30b-5p	3,6	0,0081	hsa-miR-7111-5p	0,58	0,0206
hsa-miR-148b-3p	3,6	0,0294	hsa-miR-383-3p	-0,61	0,0022
hsa-miR-182-5p	3,57	0,0302	hsa-miR-6845-3p	-0,6	0,0201
hsa-miR-6749-5p	3,55	0,0051	hsa-miR-7114-3p	-0,61	0,0164
hsa-miR-92b-5p	3,55	0,0039	hsa-mir-6880	-2,93	0,0156
hsa-miR-6771-5p	3,52	0,0081	hsa-mir-320e	-3,27	0,0145
hsa-miR-150-5p	3,47	0,0316	hsa-miR-6732-5p	-3,34	0,0107
hsa-miR-92b-3p	3,44	0,0178	hsa-miR-8075	-3,84	0,0111
hsa-miR-532-5p	3,39	0,0369	hsa-miR-2115-5p	-4,77	0,0052
hsa-miR-4741	3,37	0,0137	hsa-miR-3613-5p	-5,01	0,0041

Apêndice 4. Relação completa de microRNAs com expressão diferencial associada aos estágios clínicos do linfoma difuso de grandes células B

miRNA	log_2FC (III-IV/I-II)	Valor-p	miRNA	log_2FC (III-IV/I-II)	Valor-p
hsa-miR-107	8,45	0,011	hsa-miR-199a-5p	2,25	0,0364
hsa-let-7a-5p	8,14	0,0214	hsa-miR-4665-5p	2,2	0,0052
hsa-miR-103a-3p	7,93	0,008	hsa-miR-146b-5p	2,2	0,0332
hsa-miR-221-3p	7,76	0,0067	hsa-miR-6085	2,2	0,0471
hsa-miR-126-3p	7,6	0,0153	hsa-miR-4656	2,1	0,0127
hsa-miR-23b-3p	7,21	0,006	hsa-miR-532-5p	2,09	0,0465
hsa-miR-22-3p	6,85	0,0203	hsa-miR-127-3p	2,07	0,0329
hsa-miR-26a-5p	6,65	0,0331	hsa-miR-1225-5p	2,05	0,0201
hsa-miR-744-5p	6,65	0,0207	hsa-miR-3648	2,01	0,0064
hsa-miR-93-5p	6,56	0,0123	hsa-miR-328-3p	1,99	0,043
hsa-let-7d-5p	6,51	0,0036	hsa-miR-18b-5p	1,95	0,0338
hsa-miR-4454	6,5	0,0316	hsa-miR-6870-5p	1,94	0,0384
hsa-miR-106a-5p	6,5	0,021	hsa-miR-6769b-5p	1,91	0,0497
hsa-miR-17-5p	6,38	0,01	hsa-mir-484	1,91	0,0363
hsa-miR-425-5p	6,3	0,0268	hsa-miR-1273h-5p	1,88	0,0343
hsa-miR-106b-5p	6,24	0,0181	hsa-miR-6875-5p	1,84	0,0125
hsa-let-7c-5p	6,2	0,0045	hsa-miR-4634	1,84	0,043
hsa-miR-23a-3p	6,16	0,0249	hsa-mir-486-2	1,83	0,0008
hsa-miR-652-3p	6,11	0,0194	hsa-miR-3197	1,79	0,0055
hsa-miR-191-5p	6,11	0,0103	hsa-miR-330-3p	1,78	0,0259
hsa-miR-92a-3p	5,93	0,0132	hsa-miR-4532	1,73	0,0284
hsa-miR-130b-3p	5,73	0,0271	hsa-miR-378f	1,73	0,03
hsa-miR-15b-5p	5,7	0,0044	hsa-miR-4446-3p	1,72	0,0235
hsa-miR-199a-3p	5,7	0,0068	hsa-miR-6802-5p	1,7	0,005
hsa-miR-199b-3p	5,7	0,0068	hsa-miR-6819-5p	1,69	0,0028
hsa-miR-181a-5p	5,7	0,0192	hsa-miR-6781-5p	1,62	0,0087
hsa-miR-361-5p	5,68	0,0136	hsa-miR-378i	1,6	0,0333
hsa-miR-584-5p	5,65	0,006	hsa-miR-664a-5p	1,53	0,0364
hsa-miR-185-5p	5,54	0,0042	hsa-miR-5196-5p	1,48	0,0281
hsa-miR-222-3p	5,52	0,0244	hsa-mir-3656	1,44	0,0138
hsa-miR-6789-5p	5,45	0,014	hsa-miR-6852-5p	1,44	0,0446
hsa-let-7b-5p	5,45	0,0181	hsa-miR-4750-5p	1,44	0,0366
hsa-miR-20b-5p	5,4	0,0065	hsa-mir-423	1,41	0,0016
hsa-miR-151a-5p	5,36	0,0077	hsa-miR-671-5p	1,41	0,0024
hsa-miR-18a-5p	5,31	0,0071	hsa-miR-4655-5p	1,4	0,0053
hsa-miR-223-3p	5,17	0,0215	hsa-miR-6824-5p	1,39	0,0198
hsa-miR-486-5p	5,07	0,0418	hsa-miR-342-5p	1,39	0,0249
hsa-miR-423-3p	5,02	0,01	hsa-mir-4758	1,38	0,0209
hsa-let-7e-5p	4,96	0,0029	hsa-miR-194-5p	1,36	0,0288
hsa-miR-27a-3p	4,96	0,0055	hsa-mir-139	1,34	0,0464
hsa-miR-151a-3p	4,9	0,0099	hsa-mir-4758	1,33	0,0435
hsa-miR-6780b-5p	4,9	0,0184	hsa-miR-3615	1,3	0,0323
hsa-let-7g-5p	4,9	0,0031	hsa-miR-339-5p	1,26	0,0463
hsa-miR-24-3p	4,79	0,0069	hsa-miR-939-5p	1,18	0,0228
hsa-let-7i-5p	4,77	0,0294	hsa-miR-128-3p	1,17	0,0372
hsa-miR-378a-3p	4,72	0,0256	hsa-miR-181d-5p	1,17	0,0253
hsa-miR-4484	4,64	0,0273	hsa-mir-1233-1	1,15	0,0073
hsa-miR-140-3p	4,51	0,0104	hsa-mir-1233-2	1,15	0,0073
hsa-miR-423-5p	4,42	0,0404	hsa-miR-4710	1,14	0,0157

continua...

...continuação

hsa-miR-146a-5p	4,42	0,0438	hsa-miR-4732-5p	1,13	0,0255
hsa-miR-4734	4,4	0,0318	hsa-miR-6812-5p	1,12	0,0198
hsa-miR-30d-5p	4,38	0,0106	hsa-miR-4539	1,1	0,0415
hsa-miR-151b	4,25	0,02	hsa-miR-197-5p	1,05	0,0393
hsa-miR-4306	4,19	0,0032	hsa-miR-1285-3p	1,04	0,0291
hsa-miR-3621	4,18	0,0288	hsa-miR-6795-5p	1,01	0,0132
hsa-miR-486-3p	4,13	0,0089	hsa-mir-4634	0,97	0,0195
hsa-miR-27b-3p	4,02	0,0076	hsa-miR-6877-5p	0,94	0,0479
hsa-miR-15a-5p	3,95	0,0135	hsa-miR-5572	0,92	0,0342
hsa-let-7f-5p	3,94	0,0078	hsa-mir-486-2	0,91	0,0331
hsa-miR-7107-5p	3,93	0,0355	hsa-miR-7109-5p	0,91	0,0358
hsa-miR-4649-5p	3,93	0,0336	hsa-mir-4734	0,88	0,0205
hsa-miR-4739	3,87	0,0276	hsa-miR-6746-5p	0,87	0,0028
hsa-miR-3663-3p	3,83	0,0099	hsa-miR-30c-5p	0,84	0,0475
hsa-miR-1301-3p	3,79	0,0049	hsa-miR-1202	0,83	0,011
hsa-miR-152-3p	3,78	0,0235	hsa-miR-504-3p	0,82	0,027
hsa-miR-1207-5p	3,73	0,0128	hsa-mir-4674	0,81	0,0026
hsa-miR-6749-5p	3,73	0,0239	hsa-miR-195-5p	0,81	0,0497
hsa-miR-6752-5p	3,66	0,0321	hsa-miR-30b-3p	0,81	0,0321
hsa-miR-4463	3,54	0,0302	hsa-miR-6889-5p	0,81	0,0324
hsa-miR-139-5p	3,51	0,0191	hsa-miR-424-3p	0,8	0,0401
hsa-miR-145-5p	3,46	0,0129	hsa-miR-4667-5p	0,78	0,0285
hsa-miR-4433b-3p	3,45	0,029	hsa-mir-3679	0,77	0,0053
hsa-miR-28-3p	3,41	0,0188	hsa-miR-6757-5p	0,76	0,0347
hsa-miR-4741	3,4	0,0289	hsa-miR-4322	0,73	0,0158
hsa-miR-342-3p	3,36	0,0228	hsa-miR-422a	0,71	0,0344
hsa-miR-432-5p	3,34	0,0131	hsa-miR-8073	0,7	0,0013
hsa-miR-106b-3p	3,31	0,0294	hsa-miR-505-3p	0,7	0,0234
hsa-miR-1909-3p	3,3	0,0299	hsa-miR-1292-5p	0,7	0,022
hsa-miR-1268a	3,29	0,0239	hsa-miR-6792-5p	0,69	0,0082
hsa-miR-6132	3,28	0,0005	hsa-miR-610	0,69	0,0358
hsa-miR-130a-3p	3,26	0,0216	hsa-miR-4721	0,69	0,0091
hsa-miR-1307-3p	3,2	0,0312	hsa-mir-1301	0,65	0,0432
hsa-miR-23a-5p	3,18	0,014	hsa-miR-491-5p	0,65	0,0464
hsa-miR-625-5p	3,11	0,0366	hsa-miR-25-5p	0,62	0,0237
hsa-miR-4758-5p	3,1	0,032	hsa-miR-4800-3p	0,62	0,0463
hsa-miR-629-5p	3,09	0,0146	hsa-miR-500b-3p	0,62	0,0074
hsa-miR-4459	3,07	0,0165	hsa-miR-371b-5p	0,61	0,0432
hsa-miR-1343-5p	3,06	0,0404	hsa-mir-7114	0,61	0,0337
hsa-miR-21-5p	2,99	0,0269	hsa-miR-6894-5p	0,58	0,0229
hsa-miR-28-5p	2,99	0,0197	hsa-miR-4515	-0,6	0,0003
hsa-mir-4281	2,91	0,0187	hsa-mir-124-1	-0,62	0,0037
hsa-mir-361	2,88	0,013	hsa-mir-124-2	-0,62	0,0037
hsa-miR-200c-3p	2,82	0,0162	hsa-mir-124-3	-0,62	0,0037
hsa-miR-4433-3p	2,81	0,0203	hsa-miR-6077	-0,71	0,0182
hsa-miR-181b-5p	2,76	0,0098	hsa-mir-6836	-1,56	0,0424
hsa-mir-6089-1	2,76	0,0487	hsa-mir-4530	-1,71	0,0111
hsa-mir-6089-2	2,76	0,0487	hsa-miR-6776-5p	-1,72	0,0232
hsa-miR-6891-5p	2,69	0,0105	hsa-mir-550a-1	-2,55	0,0058
hsa-miR-425-3p	2,59	0,0173	hsa-mir-550a-2	-2,55	0,0058
hsa-miR-378c	2,49	0,0171	hsa-mir-550a-3	-2,55	0,0058
hsa-miR-125a-5p	2,49	0,0456	hsa-miR-4487	-2,78	0,0448
hsa-miR-339-3p	2,49	0,0201	hsa-miR-3613-5p	-3,11	0,0217
hsa-miR-6813-5p	2,45	0,0223	hsa-mir-320e	-3,15	0,0101

continua...

...continuação

hsa-miR-484	2,42	0,037	hsa-miR-6732-5p	-3,15	0,008
hsa-miR-2110	2,4	0,0085	hsa-miR-4706	-3,25	0,0009
hsa-miR-4689	2,34	0,0014	hsa-miR-8075	-3,3	0,009
hsa-miR-4695-5p	2,33	0,0246	hsa-mir-6722	-3,45	0,0116
hsa-miR-6778-5p	2,33	0,0159	hsa-miR-4722-3p	-3,52	0,0014
hsa-miR-3180	2,3	0,0197	hsa-miR-6750-5p	-4,03	0,037
hsa-miR-210-3p	2,29	0,0188	hsa-miR-2277-5p	-4,7	0,0006
hsa-miR-4690-5p	2,28	0,0183	hsa-miR-378h	-5,07	0,0078
hsa-miR-92b-5p	2,27	0,0322	hsa-mir-6776	-5,3	0,0143
hsa-miR-4284	2,27	0,0481	hsa-miR-6511b-5p	-5,45	0,007
hsa-miR-7847-3p	2,26	0,0211	-	-	-

Apêndice 5. Relação completa de microRNAs diferencialmente expressos segundo o desfecho clínico no linfoma difuso de grandes células B

miRNA	log_2FC (Óbito/RC)	Valor-p	miRNA	log_2FC (Óbito/RC)	Valor-p
hsa-miR-15a-5p	4,93	0,035	hsa-miR-431-5p	1,18	0,0067
hsa-miR-339-3p	4,43	0,0481	hsa-miR-485-5p	1,18	0,005
hsa-miR-532-5p	4,29	0,016	hsa-miR-550b-2-5p	1,18	0,0417
hsa-miR-629-5p	4,01	0,0407	hsa-miR-1292-5p	1,16	0,0211
hsa-miR-148b-3p	3,94	0,0335	hsa-miR-409-5p	1,07	0,0043
hsa-miR-432-5p	3,79	0,0209	hsa-miR-877-5p	1,05	0,0314
hsa-miR-409-3p	3,74	0,0301	hsa-miR-99b-3p	1,05	0,0171
hsa-miR-425-3p	3,53	0,0188	hsa-miR-3120-3p	1,04	0,0257
hsa-miR-210-3p	3,43	0,0252	hsa-miR-654-5p	1,01	0,0015
hsa-miR-148a-3p	3,15	0,0179	hsa-miR-671-5p	0,97	0,0393
hsa-miR-18b-5p	3,13	0,0212	hsa-miR-1229-5p	0,92	0,0407
hsa-miR-127-3p	3,08	0,0072	hsa-mir-106b	0,91	0,0356
hsa-miR-330-3p	3,03	0,0351	hsa-mir-423	0,9	0,0355
hsa-miR-502-3p	3,02	0,0168	hsa-miR-378d	0,9	0,0248
hsa-miR-378i	3	0,0421	hsa-miR-504-3p	0,89	0,0204
hsa-miR-500a-3p	2,84	0,0246	hsa-mir-6852	0,86	0,0003
hsa-miR-382-5p	2,73	0,0152	hsa-miR-491-5p	0,84	0,0339
hsa-miR-2110	2,7	0,0159	hsa-miR-493-3p	0,84	0,0112
hsa-miR-501-3p	2,58	0,0296	hsa-miR-29b-2-5p	0,82	0,0077
hsa-miR-766-5p	2,19	0,0155	hsa-miR-25-5p	0,78	0,0289
hsa-miR-433-3p	1,83	0,0033	hsa-miR-452-5p	0,78	0,0049
hsa-miR-331-5p	1,77	0,0129	hsa-miR-22-5p	0,76	0,0388
hsa-miR-379-5p	1,74	0,0085	hsa-miR-27b-5p	0,75	0,031
hsa-miR-17-3p	1,66	0,0068	hsa-miR-337-5p	0,72	0,0105
hsa-miR-550a-3-5p	1,62	0,0205	hsa-miR-654-3p	0,72	0,0007
hsa-miR-1285-3p	1,61	0,0423	hsa-miR-125a-3p	0,69	0,0135
hsa-miR-30b-3p	1,58	0,022	hsa-miR-652-5p	0,69	0,0023
hsa-miR-19a-3p	1,57	0,0285	hsa-miR-7851-3p	0,69	0,0139
hsa-miR-363-3p	1,57	0,0481	hsa-miR-1915-5p	0,66	0,0209
hsa-miR-874-3p	1,45	0,0018	hsa-miR-5010-5p	0,65	0,009
hsa-miR-370-3p	1,41	0,023	hsa-miR-224-3p	0,64	0,0185
hsa-miR-665	1,36	0,0402	hsa-mir-320a	0,62	0,0485
hsa-miR-550a-5p	1,36	0,0322	hsa-miR-5739	0,61	0,0455
hsa-miR-422a	1,31	0,0257	hsa-miR-3177-3p	0,59	0,0089
hsa-miR-503-5p	1,23	0,0354	hsa-miR-4508	-0,6	0,044
hsa-miR-362-5p	1,19	0,0009	hsa-miR-6791-5p	-0,69	0,048