

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Linfomas: Biomarcadores de Diagnóstico, Prognóstico e Eficácia Terapêutica

Maria Leonor Baleca Ferreira

Monografia orientada pela Professora Doutora Adelaide Maria Afonso
Fernandes Borralho, Professora Associada.

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2025

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Linfomas: Biomarcadores de Diagnóstico, Prognóstico e Eficácia Terapêutica

Maria Leonor Baleca Ferreira

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Adelaide Maria Afonso
Fernandes Borralho, Professora Associada.

2025

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à minha orientadora Professora Doutora Adelaide Fernandes Borralho por me ter ajudado a definir o tema na minha área de eleição e ter aceite orientar a minha tese. Por todos os ensinamentos, apoio e palavras amigas, pela paciência e calma para comigo.

Um enorme obrigada aos meus pais, Fátima e Nuno, por sempre me terem proporcionado tudo para que concluísse esta fase com êxito, por me terem tornado a pessoa trabalhadora, ágil e educada que hoje sou, por sempre me terem inspirado a melhorar e a seguir os seus passos, obrigada pelos conselhos, colo e, especialmente, pela família unida e coesa que geraram. À minha irmã, Rita, pelos momentos de leveza, gargalhada, cumplicidade e amizade que me inspiraram a dar o meu melhor para que um dia ela possa olhar para mim como um exemplo e chegar ainda mais longe. Ao meu namorado, amigo e companheiro, André, que sempre me levantou quando cai, que me abraçou quando precisei e acreditou em mim quando eu própria duvidava, deu-me um sorriso nos dias tristes, fazendo com que todos os dias me sentisse a mulher mais feliz do mundo. A estes quatro pilares da minha vida, um profundo agradecimento por confiarem e acreditarem nas minhas capacidades, sem eles não conseguiria chegar aqui.

Deixo ainda uma nota de agradecimentos às minhas tias, Lurdes e Celeste, e madrinha, Paula, que em muito contribuíram para o meu sucesso e sei o quanto as enche de orgulho finalizar esta etapa da minha vida.

Por fim, homenagear todos os meus avós, em especial, o avô João e a avó Rosa, que apesar de não poderem ter acompanhado fisicamente todo o meu percurso, estiveram sempre presentes na minha alma, pensamento e coração, dando-me força para caminhar. Ao meu querido avô e amigo Heitor, que tanto se orgulhou de me ver entrar neste curso, mas que infelizmente, dada a sua doença, não se lembrará de me ver terminar. Obrigada por todos os momentos em que estivemos juntos, tornaram-se dias especiais nesta jornada.

Considero-me muito sortuda por ter tido este apoio, de cada um à sua maneira, sendo esta conquista partilhada com todos mencionados. Obrigada!

Declaração

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

Os linfomas são neoplasias hematológicas que afetam o sistema linfático e apresentam grande heterogeneidade, distinguindo-se pelas suas características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas, genéticas e moleculares. Esta diversidade reflete-se na existência de vários subtipos de linfoma de Hodgkin (LH) e de linfoma não Hodgkin (LNH), o que torna o diagnóstico, a definição do prognóstico e a escolha da terapêutica mais adequadas tarefas particularmente exigentes. Neste cenário, os biomarcadores têm assumido um papel cada vez mais relevante, ajudando a refinar a classificação da doença, a antecipar a resposta ao tratamento e a acompanhar a sua evolução ao longo do tempo.

Esta revisão da literatura aborda os principais biomarcadores utilizados na prática clínica em doentes com linfoma, incluindo marcadores genéticos, moleculares, imunohistoquímicos e imagiológicos. São também referidos biomarcadores emergentes, com potencial de aplicação futura, e discutidas as suas principais vantagens e limitações. Entre os exemplos analisados, destacam-se a expressão de CD15 e CD30 no LH clássico, a presença de CD20 no LH nodular com predomínio linfocitário e as alterações nos genes BCL-2, BCL-6 e MYC em linfomas de maior agressividade. Técnicas como a imunohistoquímica, a citometria de fluxo e a sequenciação genética têm sido fundamentais na sua identificação.

É igualmente sublinhada a importância destes biomarcadores na estratificação do risco, permitindo avaliar a agressividade da doença e orientar escolhas terapêuticas mais ajustadas a cada caso. Biomarcadores imagiológicos, como o PET, assumem também um papel de relevo na avaliação precoce da resposta ao tratamento.

Apesar dos progressos, persistem desafios importantes, como a necessidade de maior padronização nos procedimentos laboratoriais e a variabilidade na interpretação dos resultados. Ainda assim, a integração sistemática de biomarcadores na prática clínica contribui para diagnósticos mais precisos e para a definição de estratégias terapêuticas mais eficazes, seguras e adaptadas a cada doente, aproximando a prática oncológica da medicina verdadeiramente personalizada.

Palavras-chave: Biomarcadores; Diagnóstico; Hodgkin; Linfoma; Prognóstico.

Abstract

Lymphomas are haematological neoplasms that affect the lymphatic system and exhibit considerable heterogeneity, being distinguished by their clinical, morphological, immunophenotypic, genetic, and molecular characteristics. This diversity is reflected in the existence of various subtypes of Hodgkin lymphoma (HL) and non-Hodgkin lymphoma (NHL), which makes diagnosis, prognosis definition, and the selection of the most appropriate therapy particularly demanding tasks. In this context, biomarkers have taken on an increasingly relevant role, helping to refine disease classification, anticipate treatment response, and monitor disease progression over time.

This literature review addresses the main biomarkers used in clinical practice in patients with lymphoma, including genetic, molecular, immunohistochemical, and imaging markers. Emerging biomarkers with potential future applications are also mentioned, as well as a discussion of their main advantages and limitations. Among the examples analysed are the expression of CD15 and CD30 in classical HL, the presence of CD20 in nodular lymphocyte-predominant HL, and genetic alterations in the BCL2, BCL6, and MYC genes in more aggressive lymphomas. Techniques such as immunohistochemistry, flow cytometry, and genetic sequencing have been fundamental in their identification.

The importance of these biomarkers in risk stratification is also emphasised, allowing for the assessment of disease aggressiveness and the selection of more tailored therapeutic strategies. Imaging biomarkers, such as PET, also play a key role in the early assessment of treatment response.

Despite progress, important challenges remain, such as the need for greater standardisation in laboratory procedures and the variability in result interpretation. Even so, the systematic integration of biomarkers into clinical practice contributes to more accurate diagnoses and the definition of more effective, safer, and patient-centred therapeutic strategies, bringing oncological practice closer to truly personalised medicine.

Keywords: Biomarkers; Diagnosis; Hodgkin; Lymphoma; Prognosis

Abreviaturas

ABC – Células B ativadas

ABF1 - Fator 1 de células B ativado

ABVD – Quimioterapia combinada de: doxorubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina

AITL - Linfoma angioimunoblástico de células T

ALCL - Linfoma anaplásico grande

ALK: Cinase do linfoma anaplásico/ *Anaplastic Lymphoma Kinase*

ARID1A – Proteína 1A contendo domínio interativo rico em AT

ATIC – 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferase/ IMP ciclohidrolase

ATP - Trifosfato de adenosina

BAFF – Fator de ativação das células B

BAFFR – Recetor BAFF

BCL – Proto-oncogene inibidor da apoptose

BCRs – Recetores das células B

BEACOPP – Quimioterapia combinada de: sulfato de bleomicina, fosfato de etoposídeo, cloridrato de doxorubicina, ciclofosfamida, sulfato de vincristina, cloridrato de procarbazona e prednisona

BOB1 - Proteína 1 de ligação ao octâmero específica de células B

CARD11 – Família 11 do domínio de recrutamento de caspase

CAR-T - Células T do recetor de antígeno quimérico

CCL3 – Ligando 3 de quimiocinas com ligação C-C; também conhecida como proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α)

CCR4 – Recetor 4 de quimiocinas com ligação C-C

CD – *Cluster* de diferenciação

CDKN2A – Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A/supressor de tumores

cfDNA - DNA livre de células

cHL – Linfoma de Hodgkin clássico

CHOEP - CHOP + etoposídeo

CHOP – Quimioterapia combinada de: ciclofosfamida, cloridrato de doxorubicina, sulfato de vincristina e prednisona

CIITA – Transativador da Classe II

CREBBP - Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc

CSF-1R - Recetor do fator estimulador de colónias-1

CSR - *Class Switch Recombination*

CTCL - Linfoma cutâneo de células T

ctDNA - DNA tumoral circulante

CTLA4 - Proteína 4 associada aos linfócitos T citotóxicos

CVP – Quimioterapia combinada de: ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona

CXCLs – Ligantes de quimiocinas CXC

CXCRs – Recetores de quimiocinas CXC

DDX3X - *DEAD-Box Helicase 3 X-Linked*

DLBCL - Linfoma difuso de grandes células B

Dmax – Distância entre as duas lesões mais distantes

DNMT3A - DNA (citosina-5)-metiltransferase 3 alfa

DSS - Sobrevivência específica da doença

DTX1 - Deltex 1, regula a anergia dos linfócitos T

DUSP22 - Proteína fosfatase 2 de dupla especificidade

EBER - Pequenos RNA codificados pelo vírus Epstein-Barr

EBF1 – Fator 1 de células B precoce

EBV – Vírus Epstein-Barr

EMZL - Linfoma extranodal da zona marginal

ENKTL-N - Linfoma extranodal de células NK

EOMES – Gene codificador de proteínas Eomesodermina

EP300 - Proteína p300 de ligação à região inicial do adenovírus

EZH2 – Potenciador do *Zeste Homolog 2*

FCI - Imunofenotipagem por citometria de fluxo

FDC - *Follicular Dendritic Cell*

FDG – Fluodesoxiglicose-18

FFS – Sobrevida livre de falha

FISH - Hibridização fluorescente *in situ*

FL – Linfoma folicular

FOXO1 - *Forkhead Box O1*

FOXP – Proteína P *forkhed box*

GAS5 - Transcrição específica para paragem de crescimento 5

GATA3 - Fator de transcrição de importante na proliferação, desenvolvimento e diferenciação celular

GC – Centro germinativo

GCB – Células B do centro germinativo

GCET1 - Transcrição 1 expressa pelas células B do centro germinativo

GI – Gastrointestinal

GNA13 - Subunidade da Proteína G Alfa 13

GPR34 – *G Protein-Coupled Receptor 34*

GTP - Guanosina Trifosfato

H2AX – Histona 2AX

H3K27 - Metilação da lisina 27 na histona 3

HCV - Vírus da hepatite C

HGAL - Linfoma associado ao centro germinativo humano

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA-DR – Isótipo DR do Antígeno Leucocitário Humano

HOTAIR - RNA intergénico *antisense* transcrito de HOX

HOTTIP - RNA distal *antisense* transcrito de HOXA

HRS – Células malignas de Hodgkin e Reed–Sternberg

HULC – Gene altamente regulado no cancro do fígado

HX - Hipoxantina A

IBPs – Inibidores da bomba de prótons

ICI - Inibidor do ponto de controlo imunológico

ICOS – Coestimulador induzível de células T

ID2 - Proteína hélice-ansa-hélice

IDH2 - Isocitrato Desidrogenase 2

IDO-1 - Indoleamina-2,3-dioxigenase

IFN γ – Interferão gama

IF-RT – Radioterapia de campo envolvido

Ig/s – Imunoglobulina/s

IGHM – Genes da região constante da cadeia pesada da imunoglobulina

IGHV - Genes da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina

IHC – Imuno-histoquímica

IHQ – Imunohistoquímica

IL/s – Interleucina/s

IRF - Fator Regulador do Interferão

ISRT - Radioterapia do sítio envolvido

ITPKB - Inositol-Trisfosfato 3-quinase B

JAK - Janus *kinase*

JUNB – Membro da família AP-1 do fator de transcrição

Ki-67 - Proteína nuclear associada à proliferação celular

KMT2D – Histona-lisina N-metiltransferase 2D

KRAS – Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten

LAG3 - Gene 3 de ativação dos linfócitos

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LDH - Lactato desidrogenase

LDHL – Linfoma de Hodgkin com depleção de linfócitos

LH – Linfoma de Hodgkin

LMO2 – Gene 2 do *LIM Domain Only*

LMP - Proteína de membrana latente

LMR – Razão linfócitos/monócitos

lncRNAs – RNAs não codificantes longos

LNH – Linfoma não-Hodgkin

LP - *Lymphocyte Predominant*

LRHL – Linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos

MALT – Tecido linfoide associado à mucosa

MAP3K - Proteína quinase quinase quinase ativada por mitogéneo

MCHL – Linfoma de Hodgkin clássico de celularidade mista

MCL – Linfoma de células do manto

MEF2B - Fator de ligação do potenciador de miócitos 2B

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

miRNAs - MicroRNAs

mTORC1 – Alvo mecânico do complexo 1 da rapamicina

MUM - Oncogene do mieloma múltiplo

MYC - *Myelocytomatosis oncogene*

MYD88 – Fator de diferenciação mieloide 88

ncRNA – RNAs não codificantes circulantes

NFKBIE/ NFKB1A – Supressores do fator nuclear-κB

NF-κB - Fator nuclear-κB: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NGS – Sequenciamento de última geração

NK – células Natural Killer

NLP-HL – Linfoma de Hodgkin predominante em linfócitos nodulares

NLR – Razão neutrófilo/linfócito

NOTCH - Reguladores da hematopoiese e da diferenciação das células imunológicas

NPM1 – Nucleofosmina 1

NSHL – Linfoma de Hodgkin clássico de esclerose nodular

OCT2 - Proteína 2 de ligação ao octâmero

OS – Sobrevivência global

P2RY8 - Recetor com funções estabelecidas na inibição da migração das células B do centro germinativo (GC) e na regulação do crescimento

PAX-5 - *Paired Box 5*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCs – Células plasmáticas

PD/s – Proteína/s de morte celular programada

PDL/s – Ligante de proteína/s de morte celular programada

PEG10 - Gene 10 expresso paternalmente

PET – Tomografia por emissão de positrões

PFS – Sobrevida livre de progressão

PI3K/AKT – Via de sinalização fosfoinosítido 3-quinase

PLR – Razão plaquetas/linfócitos

PRDM1 - Proteína-1 de maturação induzida por linfócitos B

PTCL - Linfoma periférico de células T

PTCL-NOS – PTCL sem outra especificação

PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog*

PTPN - Proteína tirosina fosfatase não recetora

PU.1 - Fator de transcrição *box-1* rico em purina

qPCR – PCR quantitativa

RB1 - Retinoblastoma 1

R-CHOP – Quimioterapia combinada de: rituximab, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona

RHOA - Membro da família homóloga Ras A

ROR1-AS1 - ROR1 *Antisense* RNA 1; lncRNA

ROS1 – Recetor tirosina quinase

RT – Radioterapia

RT-PCR – *Real Time* PCR

S1PR2 - Recetor de esfingosina-1-fosfato

SGK1- Quinase 1 regulada por soro e glicocorticoide

SII - Índice de inflamação imunológica sistêmica

SNC – Sistema Nervoso Central

SOCS - Supressores de sinalização de citocinas

SPEN – Gene supressor de tumor

SPIB - Fator de Transcrição Spi-B

STAT - Transdutor de sinal e ativador da transcrição

SUV_{max} – Valor máximo de supressão padrão

TAMs – Macrófagos associados a tumores

TARC - Timo e quimiocina regulada por ativação

TBL1XR1 – *Transducin Beta Like 1 X-Linked Receptor 1*

TBX21 – Fator de Transcrição T-Box 21

TCF4 – Fator de transcrição 4

TET - *Ten-Eleven Translocation*

TFH – Fenótipo T *follicular helper*

TGF-β – Fator de crescimento transformador beta

TH – Linfócitos T-*helper*

THRLBL - Linfoma de grandes células B rico em células T

TLG - Glicólise de Lesão Tumoral

TLR – *Toll-Like Receptors*

TME – Microambiente tumoral

TMV – Volume metabólico do tumor

TNF – Fator de necrose tumoral

TNFAIP/s - Gene da proteína induzida pelo fator de necrose tumoral alfa

TNFRS14 - Membro da superfamília 14 do recetor do fator de necrose tumoral

TP53 – Proteína supressora de tumor p53

TP63 - Proteína supressora de tumor p63

TPM3 - Tropomiosina 3

TRAF - Fator associado ao recetor do fator de necrose tumoral

TYK2 – Tirosina quinase 2

USA – Estados Unidos da América

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

XPO – Exportina

β 2-MG - β 2-microglobulina

Índice

1. Introdução	20
2. Objetivos	21
3. Materiais e Métodos	22
4. Linfomas: Aspectos Gerais	22
4.1. Tipos de Linfomas	22
4.1.1. Linfoma de Hodgkin	25
4.1.1.1. Classificação	25
4.1.1.2. Etiologia e Fisiopatologia	26
4.1.1.3. Epidemiologia	28
4.1.1.4. Terapêutica Atual	28
4.1.2. Linfoma não-Hodgkin	30
4.1.2.1. Classificação	30
4.1.2.2. Etiologia e Fisiopatologia	31
4.1.2.3. Epidemiologia	34
4.1.2.4. Terapêutica Atual	34
5. Biomarcadores	37
5.1. Principais Técnicas de Detecção de Biomarcadores	37
5.2. Biomarcadores no Diagnóstico de Linfomas	40
5.2.1. Biomarcadores de Diagnóstico no Linfoma de Hodgkin	40
5.2.1.1. Biomarcadores de Alteração Genética	40
5.2.1.2. Biomarcadores Imunohistoquímicos/ de Imunofenótipo	43
5.2.2. Biomarcadores de Diagnóstico no Linfoma não-Hodgkin	45
5.2.2.1. Biomarcadores de Alteração Genética	45
5.2.2.2. Biomarcadores Imunohistoquímicos/ de Imunofenótipo	54
5.3. Biomarcadores de Prognóstico de Linfomas	56

5.3.1.	Biomarcadores de Prognóstico no Linfoma de Hodgkin.....	56
5.3.2.	Biomarcadores de Prognóstico no Linfoma não-Hodgkin.....	58
5.4.	Biomarcadores de Eficácia Terapêutica	67
5.4.1.	Biomarcadores de Eficácia Terapêutica no Linfoma de Hodgkin	67
5.4.2.	Biomarcadores de Eficácia Terapêutica no Linfoma não-Hodgkin	68
6.	Desafios e Limitações no Uso de Biomarcadores para Linfomas.....	70
7.	Perspetivas Futuras e Avanços na Pesquisa de Biomarcadores	73
8.	Conclusão.....	76

Índice de Figuras

Figura 1 - Estimativa de Casos de Leucemia, Linfoma e Mieloma em 2024 adaptado de (4).....	20
Figura 2 - Células de Reed-Sternberg adaptado de (18).....	26
Figura 3 - Reação do centro germinativo (GC) e cenários para o desenvolvimento do cHL adaptado de (15).....	27
Figura 4 - Algoritmo terapêutico para LH em estadio inicial recém-diagnosticado, adaptado de (20).....	29
Figura 5 - Classificação dos linfomas de células T periféricos, adaptado de (29)..	34
Figura 6 - Algoritmo terapêutico no Linfoma Folicular, adaptado de (31)	36
Figura 7 - Correlação entre subtipagem morfológica/IHC e perfis de expressão génica em linfomas difusos de grandes células B, adaptado de (61).	47
Figura 8 - Vias moleculares e alterações genéticas desreguladas no linfoma folicular adaptado de (62).	50
Figura 9 - Genes mutados em linfoma MALT de acordo com o local de origem adaptado de (64).....	51

Figura 10 - Resumo gráfico dos achados no microambiente de cHL, revelando bom e mau prognóstico, adaptado (78)58

Figura 11 - EFS e OS em doentes com DLBCL (a) e linfomas de linfócitos T (b), em pré-tratamento com diferentes níveis de cfDNA adaptado de (96).....66

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características dos LH e LNH adaptado de (4,11).....23

Tabela 2 – Estádios dos Linfomas segundo Ann Arbor adaptado de (11–13)25

Tabela 3 - Designações de diagnóstico para o LNH adaptado de (21).....31

Tabela 4 - Técnicas de deteção de biomarcadores – Resumo39

Tabela 5 - Alterações genéticas cHL adaptado de (50)43

Tabela 6- Distinção fenotípica entre cHL, LRCHL e NLP-HL adaptado de (56).45

Tabela 7 - Principais alterações genéticas de acordo com o subtipo de DLBCL adaptado de (61).....48

Tabela 8 - Perfil genético dos linfomas não-Hodgkin adaptado de (28,51,58).....53

Tabela 9 - Fenótipo dos linfomas não-Hodgkin55

Tabela 10 – OS com base no subtipo de DLBCL adaptado de (68,80,81)58

Tabela 11 - Biomarcadores de prognóstico de DLBCL adaptado de (74,80–82)...60

Tabela 12 - Biomarcadores de prognóstico de FL adaptado de (74,79,85,86)62

Tabela 13 - Biomarcadores de prognóstico de linfomas MALT adaptado de (87–89)64

Tabela 14 - Biomarcadores de prognóstico de linfomas PTCL adaptado de (90) .65

1. Introdução

Linfomas são um grupo de neoplasias originadas a partir de células do sistema imunológico – os linfócitos. (1)

Os linfócitos, comumente conhecidos por “glóbulos brancos”, são células sanguíneas, que circulam tanto pela corrente sanguínea como pela corrente linfática em defesa do nosso sistema contra invasões estranhas ao nosso organismo. Podem ser diferenciados em linfócitos B, associados à produção e liberação de anticorpos; linfócitos T, responsáveis pela destruição de antígenos, quer diretamente por ação citotóxica, quer indiretamente por ativação de macrófagos ou linfócitos B; e linfócitos *Natural Killer*.

Tanto os linfócitos B como os T são originados ao nível da medula óssea, porém, apenas os linfócitos B amadurecem na mesma; os linfócitos T migram para o timo onde sofrem maturação. (2) Nestes processos desenvolvem-se mutações que poderão dar origem a um clone de células alteradas, com elevadas taxas de replicação, gerando linfomas.

Há, praticamente, 200 anos que este grupo de neoplasias tem gerado especial interesse. Em 1832, Thomas Hodgkin, responsável pela manutenção e estudo de uma coleção científica e anatômica de um hospital londrino, descreve pela primeira vez aquilo que, conhecemos como linfoma de Hodgkin. Contudo, consta-se uma possível referência a esta doença, por Marcello Malpighi, um médico de renome, em 1666. (3)

Atualmente, os linfomas continuam a ter uma forte prevalência face às restantes neoplasias sanguíneas major (Figura 1). Dados da Sociedade de Leucemias e Linfomas estimaram cerca de 89 mil novos casos de linfomas nos USA para o ano de 2024, representando 48% da incidência neste grupo de neoplasias sanguíneas. (4)

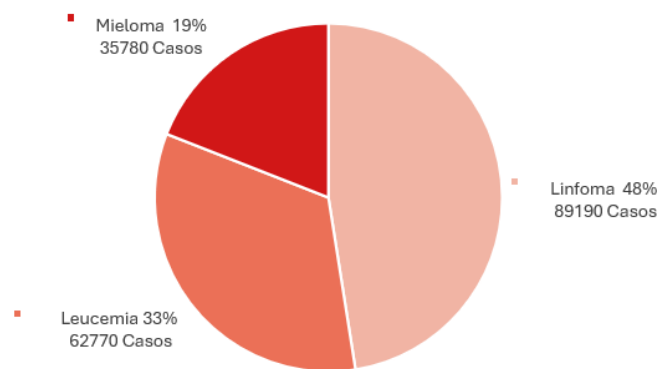


Figura 1 - Estimativa de Casos de Leucemia, Linfoma e Mieloma em 2024
adaptado de (4)

No entanto, globalmente, segundo análises estatísticas estimadas entre 2012 e 2021, tanto a taxa de incidência como a de mortalidade, em ambos os tipos de linfomas (Hodgkin e não-Hodgkin), têm vindo a reduzir, revelando avanços de diagnóstico precoce, de prognóstico e de evolução terapêutica. (5,6)

Em Portugal, a instituição *Lymphoma Coalition*, identificou cerca de 2098 novos casos de linfoma não-Hodgkin, em 2020, o que reflete uma incidência significativa na nossa população. A taxa de mortalidade apresenta-se acima da média, em comparação com os países participantes no estudo. Quanto ao linfoma de Hodgkin, tanto a incidência como a taxa de mortalidade em Portugal são menos preocupantes, no entanto, o seu diagnóstico e evolução terapêutica não deixam de ser pilares relevantes para que se continue a verificar a necessidade de otimização destes parâmetros. (7)

Com os avanços na compreensão dos mecanismos subjacentes à origem dos linfomas, surgiram biomarcadores de diagnóstico que permitiram diferenciar os diferentes subtipos, gerando, conseqüentemente, terapêuticas mais direcionadas/personalizadas.

Por outro lado, o surgimento de biomarcadores de prognóstico tornou-se de extrema importância para a estratificação de doentes em grupos de risco, o que impactou drasticamente o direcionamento da terapêutica, bem como, os resultados clínicos dos doentes. (8) Ambos os tipos de biomarcadores culminam num forte impacto na eficácia terapêutica que, apesar de ainda ter muita margem de aperfeiçoamento, tem vindo a progredir a um bom ritmo.

2. Objetivos

Neste contexto, esta revisão da literatura tenciona explorar, aprofundadamente, o papel dos diferentes biomarcadores em linfomas. Pretende-se: identificar e rever os biomarcadores mais relevantes para um diagnóstico preciso; proceder à avaliação do seu impacto de acordo com a estratificação de risco, bem como, com a previsão da evolução clínica com base nos biomarcadores de prognóstico; e ainda explorar os biomarcadores utilizados para monitorizar a resposta/eficácia terapêutica.

Adicionalmente, analisa as atualizações mais recentes da literatura, destacando os avanços científicos, bem como, algumas lacunas que persistem, com vista a contribuir para a otimização do tratamento clínico destas neoplasias, propondo caminhos para futuras investigações e possíveis inovações na área.

3. Materiais e Métodos

A presente dissertação foi realizada e estruturada com recurso a uma pesquisa bibliográfica exaustiva utilizando as bases de dados PubMed e Google Scholar, reconhecidas pela sua abrangência e fiabilidade na disponibilização da literatura científica na área das ciências da saúde.

A estratégia de pesquisa baseou-se na utilização de palavras-chave, selecionadas de acordo com o objetivo da investigação (p.e. Biomarcadores; Diagnóstico; Hodgkin; Linfoma; Prognóstico) e, sempre que se considerou necessário foram aplicados filtros para restringir resultados a publicações dos últimos 5 anos.

Os artigos incluídos foram selecionados com base na sua relevância, na atualidade da informação e na credibilidade das fontes. Foram privilegiados estudos originais, revisões sistemáticas, meta-análises, entre outros, publicados em revistas com arbitragem científica.

Após a seleção e leitura dos artigos, a informação recolhida foi otimizada e transformada numa análise que culmina na identificação dos biomarcadores mais relevantes para a prática clínica atual, bem como, na discussão das suas limitações e perspetivas futuras.

4. Linfomas: Aspetos Gerais

4.1. Tipos de Linfomas

Tradicionalmente, os linfomas são classificados como linfoma de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin. (9) Recentemente, em 2017, esta classificação foi revista face à classificação da OMS relativamente aos tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfoides, atualizando a de 2008, trazendo novos subtipos, bem como, novas perspetivas de diagnóstico e tratamento. (10)

Atualmente existem mais de 80 subtipos de linfoma distintos, subtipos estes que são definidos de acordo com a sua morfologia, imunofenótipo, lesões genéticas e perfis moleculares, características clínicas e derivação celular. Dependendo do subtipo, a doença pode ser agressiva, progredir rapidamente ou ser considerada curável, com isto torna-se essencial o desenvolvimento contínuo de ferramentas de diagnóstico, estratificação prognóstica, bem como, monitorização da eficácia terapêutica. (9)

Um princípio universal na previsão do resultado de uma condição maligna é que quanto mais cedo for feito o diagnóstico, melhor será o prognóstico. Ambos os perfis de doença obedecem a este princípio e é no momento do diagnóstico que se observam as primeiras semelhanças entre os dois tipos de linfoma como descrito na Tabela 1. (11)

Tabela 1 - Características dos LH e LNH adaptado de (4,11)

Características dos linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin		
	Linfoma de Hodgkin (LH)	Linfoma não Hodgkin (LNH)
Idade de Apresentação	Jovens adultos e adultos com mais de 60 anos.	Adultos com mais de 55 anos.
Sintomas Comuns	Redução da capacidade de combater infecções, hematomas ou hemorragias, linfadenopatia palpável, “sintomas B”.	
Subtipos	cHL (4 subtipos) + NLP-HL	Mais de 60 subtipos.
Diagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> • Linfadenopatia simétrica; • Distribuição da parte superior do corpo; • Presença de células de Reed Sternberg; • Poucos marcadores celulares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Linfadenopatia assimétrica; • Locais de doenças acima e abaixo do diafragma; • Ausência de células de Reed Sternberg; • Marcadores celulares específicos, incluindo CD19 e CD20.
Tratamento (Primeira linha)	Regime de quimioterapia combinada ABVD, mais radioterapia de consolidação, se indicada.	Terapêutica medicamentosa combinada CHOP/CVP (+/- anticorpo monoclonal), mais radioterapia de consolidação, se indicada.
Prognóstico	Uma taxa de sobrevivência a 10 anos de 75%, com muitos doentes curados para a vida.	Uma taxa de sobrevivência a 5 anos de 50–70%, dependendo do estadio.

LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma não Hodgkin; cHL: Linfoma de Hodgkin clássico; NLP-HL: Linfoma de Hodgkin predominante em linfócitos nodulares; CD: Cluster de diferenciação; ABVD: Quimioterapia combinada de doxorubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina; CHOP: Quimioterapia combinada de ciclofosfamida, cloridrato de doxorubicina, sulfato de vincristina e prednisona; CVP: Quimioterapia combinada de ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona

Um sinal precoce comum entre ambos os linfomas é um aumento indolor de um ou mais gânglios linfáticos, porém, esta manifestação não é específica, visto que, pode ser o resultado de uma inflamação no corpo, não necessariamente um sinal de linfoma. (4)

Para além disso, a presença de “sintomas B”, que agrupa manifestações como febre, perda de peso e suores noturnos, sugere a probabilidade de um pior prognóstico em ambos os grupos de doentes, comparando com aqueles que apresentam um nódulo palpável ou dor causada por uma massa interna. (12)

Outras manifestações estão menos bem definidas e podem incluir indigestão, dor, infeção repetida, hematomas ou hemorragia inesperada. Embora não sejam específicos do linfoma, se um doente apresentar previamente estes sintomas, deve ser suficiente para levantar a suspeita de um diagnóstico maligno. (12)

Alguns indivíduos podem não apresentar sinais/sintomas, sendo o caso dos linfomas indolentes, onde diagnóstico é feito com o resultado de exames físicos e testes periódicos.

Tanto os doentes diagnosticados com LH e LNH são diagnosticados por biópsia dos gânglios linfáticos, seguida de uma nova biópsia da medula óssea, para confirmar um diagnóstico positivo.

Ao fazer um diagnóstico, a diferença notável nas características entre os dois linfomas está no padrão dos locais da doença. O LH está, normalmente, localizado no tecido linfático da parte superior do corpo como o pescoço, tórax e axila, sendo que, a linfadenopatia mostra frequentemente simetria, mas não é contígua. O LNH tem um padrão diferente: o agrupamento de gânglios linfáticos é comum e a doença pode apresentar-se acima/abaixo do diafragma, ou ambos, estando este último associado a um pior prognóstico. (11)

Assim, estas neoplasias são estratificadas em diferentes estadios através do sistema Ann Arbor como descrito na Tabela 2:

Tabela 2 – Estádios dos Linfomas segundo Ann Arbor adaptado de (11–13)

Estadio	Caracterização da Doença
I	Envolvimento de uma única região de gânglios linfáticos ou de um único órgão/local extralinfático. Uma única região de gânglios linfáticos pode incluir um gânglio linfático ou um grupo de gânglios linfáticos adjacentes.
II	Envolvimento de duas ou mais regiões de gânglios linfáticos do mesmo lado do diafragma ou envolvimento localizado/limitado de um órgão ou sítio extralinfático.
III	Envolvimento de regiões de gânglios linfáticos ou estruturas linfoides em ambos os lados do diafragma, possivelmente com envolvimento localizado de um órgão fora do sistema linfático ou do baço.
IV	Envolvimento extralinfático difuso/disseminado, com ou sem envolvimento linfático associado.
Variáveis Adicionais	<p>A: assintomático/indolente;</p> <p>B: presença de sintomas B ao longo de 6 meses;</p> <p>E: extensão extranodal limitada em pacientes com doença em estadio I ou envolvimento de um único sítio extranodal, contíguo ou proximal a um sítio nodal conhecido;</p> <p>S: envolvimento esplênico;</p> <p>X: doença volumosa: massa nodal >1/3 do diâmetro intratorácico ou 10 cm de dimensão.</p>

4.1.1. Linfoma de Hodgkin

4.1.1.1. Classificação

O LH surge comumente nos gânglios linfáticos cervicais e sendo o único, entre todos os linfomas de linfócitos B, com origem nas células malignas de Hodgkin e Reed–Sternberg (HRS). (14,15)

Estas células são características do linfoma de Hodgkin clássico (cHL), o subtipo mais prevalente, sendo responsável por, aproximadamente, 95% de todos os LH e é subdividido em quatro subgrupos: esclerose nodular (NSHL), onde os gânglios linfáticos envolvidos contêm elementos de tecidos fibrosos (esclerose); rico em linfócitos (LRHL), que, tal como o nome indica os gânglios linfáticos envolvidos contêm numerosos linfócitos de aparência normal e células HRS; celularidade mista

(MCHL), cujos gânglios linfáticos envolvidos contêm células HRS e vários outros tipos de células; e depleção de linfócitos (LDHL), onde os gânglios linfáticos envolvidos contêm poucos linfócitos normais, mas numerosas células HRS. Assim, os subtipos diferem entre si na apresentação, locais de envolvimento, bem como, na epidemiologia e associação com o vírus Epstein–Barr (EBV). (13–16)

Para além do cHL, também podem ser classificados em LH predominantes de linfócitos nodulares (NLP-HL), sendo estes menos comuns. (14,15)

Este subtipo é distinto do cLH em muitos aspetos importantes, incluindo o comportamento clínico, o quadro histológico, o fenótipo, o padrão de expressão génica das células do linfoma e o padrão de lesões genéticas. As células associadas a este tipo de neoplasia assemelham-se amplamente às células B do centro germinativo (GC) no seu fenótipo, recetores das células B (BCRs) funcionais, não apresentam infeção por EBV e, geralmente, não geram células multinucleares. (15)

4.1.1.2. Etiologia e Fisiopatologia

Após em 1832, Thomas Hodgkin ter descrito vários casos de um tumor que mais tarde veio a ser denominado por doença de Hodgkin, Carl Sternberg em 1898 e Dorothy Reed em 1902, descreveram, pela primeira vez, as características microscópicas do quadro histológico deste tumor, bem como, as designadas células HRS.

Estas células são características do cHL, tendo sido definidas como células grandes e multinucleadas, contendo dois núcleos de imagem espelhada (olhos de coruja) dentro de um fundo celular reativo, com uma morfologia estranha e um fenótipo que não representa qualquer tecido corporal normal (Figura 2). (14,17)

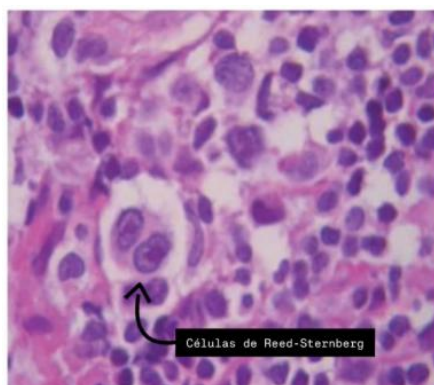


Figura 2 - Células de Reed-Sternberg adaptado de (18)

As células HRS derivam de linfócitos B do GC, com mutações do segmento da região variável das cadeias leves e pesadas da Ig. São pré-apoptóticas, tendo pouca capacidade proliferativa (Figura 3). Deste modo, a expansão de clones malignos de células HRS é impulsionada pela proliferação de células de Hodgkin mononucleares, uma vez que, estas células, provavelmente, derivam da endomitose de células de Hodgkin. (15)

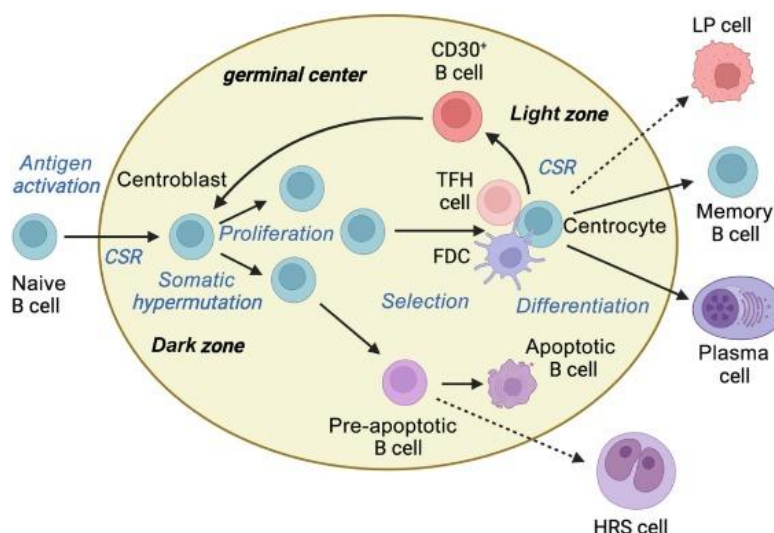


Figura 3 - Reação do centro germinativo (GC) e cenários para o desenvolvimento do cHL adaptado de (15). Os linfócitos B *naive*, após ativação antigénica, migram para o GC, onde iniciam o processo de maturação. Na *dark zone*, os centroblastos, proliferam, sofrem hipermutação somática e recombinação de mudança de classe dos genes da Ig, mecanismos que visam aumentar a afinidade do BCR ao antígeno. Os centrócitos, migram para a *light zone*, onde são sujeitas a seleção pela afinidade ao antígeno expresso pelas FDCs e TFH. As células que apresentarem elevada afinidade diferenciam-se em plasmócitos ou linfócitos B de memória, caso contrário, serão direcionadas para a morte celular. No caso do LH, acredita-se que alguns linfócitos B CD30+ do GC escapam à apoptose, apesar da sua seleção negativa; estas células apresentam rearranjos clonais da região variável das cadeias pesadas e leves da Ig, comprovando a sua origem B. Porém, exibem uma perda marcada da expressão dos genes que definem a identidade B, acompanhada de alterações epigenéticas, e, frequentemente, processos aberrantes de divisão celular, como a endomitose, que contribui para a morfologia multinucleada típica das células HRS. CSR: *Class Switch Recombination*; TFH cell: *T Follicular Helper cell*; FDC: *Follicular Dendritic Cell*; LP cell: *Lymphocyte Predominant cell*; HRS cell: *Hodgkin and Reed–Sternberg cell*

No entanto, isso não significa que as células de HRS sejam completamente irrelevantes para a fisiopatologia da doença, visto que, essas células contribuem para moldar o microambiente, pois interagem com outras células imunes e secretam diversos fatores imunomoduladores, incluindo IL-5 e o TGF- β . (15,17,19)

A etiologia exata do LH é desconhecida. Porém, há um risco acrescido em indivíduos infetados com EBV e HIV, com doenças autoimunes e imunodeprimidos. (14)

Estudos revelaram a expressão da proteína de membrana latente 1 (LMP1) codificada pelo EBV em células HRS em cerca de 40% dos casos de cHL estudados, validando uma infecção latente de células HRS por EBV numa fração substancial de casos. (15) Esta infecção latente em linfócitos B dá-se, uma vez que, o EBV infeta células B *naive*, que, ao passarem por reações no GC, culminam, finalmente, na residência do vírus em linfócitos B de memória. Uma vez infetados, inicia-se a fase de proliferação. (19) Verificou-se ainda que o EBV é mais comum nos subtipos MCHL e LDHL. (14)

4.1.1.3. Epidemiologia

A doença representa, cerca de 10% dos casos de linfoma recém-diagnosticado. A incidência de LH na Europa é de 2,2 por 100.000 por ano, com uma reduzida taxa de mortalidade, 0,7 casos/100.000 por ano. É mais frequente em homens, e os picos de incidência são observados em jovens adultos e em pessoas com mais de 60 anos.

A incidência dos subtipos de cHL é a seguinte: NSHL (70%), MCHL (25%), LRHL (5%) e LDHL (menos de 1%). O NLP-HL representa 5% dos LH em geral. (14,16)

4.1.1.4. Terapêutica Atual

O tratamento inicial do LH depende do subgrupo, existindo três subgrupos de tratamento: 1) pacientes com doença em estadio inicial com fatores prognósticos favoráveis, 2) pacientes com doença em estadio limitado que têm fatores prognósticos desfavoráveis e 3) aqueles com doença em estadio avançado.

Pacientes que estão em estadio inicial com características prognósticas favoráveis são tratados com quimioterapia de curta duração, normalmente dois ciclos de ABVD seguidos por radioterapia (RT) (Figura 4). Cada ciclo tem a duração de 28 dias, sendo todos os medicamentos administrados nos dias 1 e 15, juntamente com uma série de medicamentos de suporte adaptados às necessidades de cada doente. (11,14) A resposta à terapia é determinada por uma tomografia por emissão de pósitrons (PET), usada para otimizar a terapêutica, permitindo a redução da intensidade e toxicidade do tratamento. (14,16)

Pacientes que estão em estadio limitado da doença com características desfavoráveis, como doença volumosa ou com extensão extra-nodal, são tratados com um curso mais longo de quimioterapia (4 a 6 ciclos) seguido por uma dose maior de RT. (14)

Em doentes de estadio avançado, diferentes regimes de quimioterapia (por exemplo, BEACOPP escalonado) podem ser usados, mas o padrão de tratamento é ABVD. (14) A radiação, em geral, não é benéfica nestes pacientes. Apesar da alta taxa de cura, em média 10% dos pacientes com LH são refratários ao tratamento inicial, e até 30% dos doentes têm recaída após atingir uma remissão completa com terapia inicial. (14)

A quimioterapia de alta dose, seguida de transplante autólogo de células-estaminais, é o padrão de tratamento para doentes refratários/com recaída. Para pacientes que falham no transplante autólogo, as opções de tratamento incluem brentuximab vedotina (ao invés de bleomicina), imunoterapia com bloqueio de PD-1, transplante alogénico não mieloablativo ou outros potenciais medicamentos ainda em ensaios clínicos. (14)

A eficácia terapêutica é bastante elevada, pelo que, existe uma grande taxa de doentes que ficam curados.

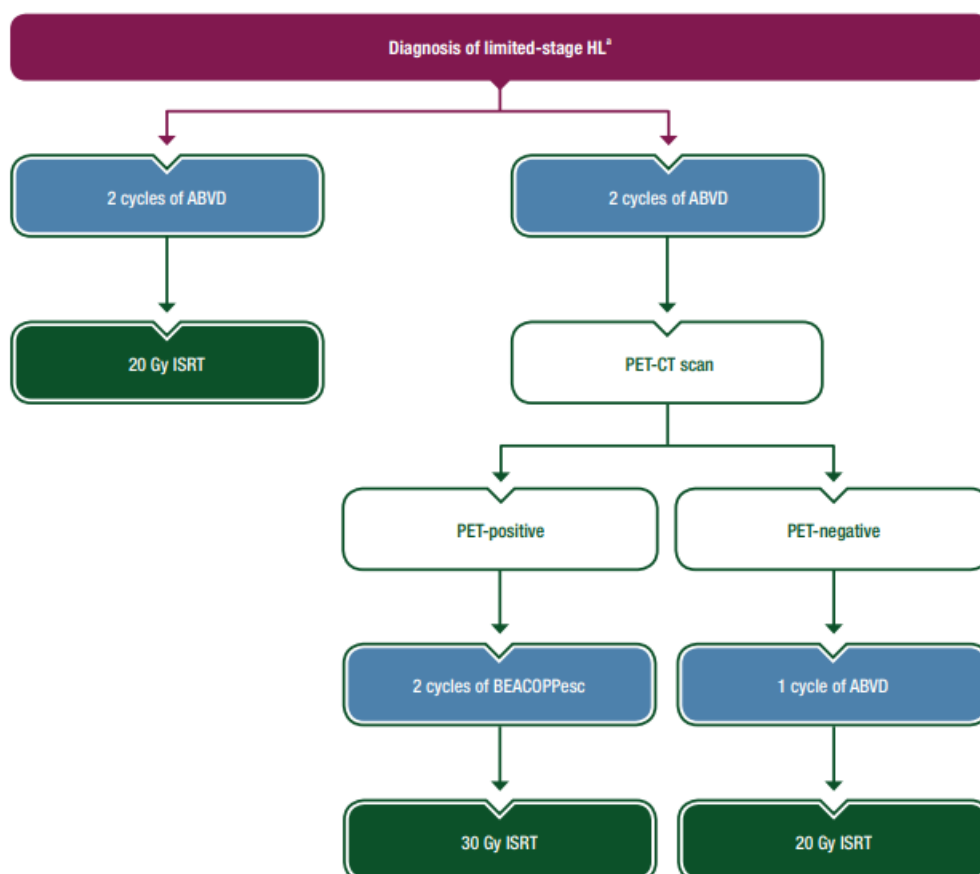


Figura 4 - Algoritmo terapêutico para LH em estadio inicial recém-diagnosticado, adaptado de (20). ABVD: doxorubicina/ bleomicina/ vinblastina/ dacarbazina; BEACOPPesc: bleomicina/ etoposídeo/ doxorubicina/ ciclofosfamida/ vincristina/ procarbazona/ prednisona em dose escalonada; CT: tomografia computadorizada; HL: linfoma de Hodgkin; ISRT: radioterapia do sítio envolvido; PET: tomografia por emissão de positrões.

4.1.2. Linfoma não-Hodgkin

4.1.2.1. Classificação

Atualmente, são conhecidos mais de 60 subtipos de LNH, categorizados de acordo com as características das células do linfoma, incluindo o seu aspeto, presença de proteínas na superfície celular e características genéticas. (21)

Existem diferentes formas de classificar este tipo de neoplasias. A Organização Mundial da Saúde classifica esta patologia baseando-se na morfologia e linhagem celular. Deste modo, dentro das categorias de linfócitos B e linfócitos T, são, ainda, reconhecidas duas subdivisões: neoplasias precursoras, que correspondem aos estádios iniciais da diferenciação, e neoplasias diferenciadas/maduras. (22)

Alguns exemplos de subtipos de LNH derivados da linhagem das células B englobam o linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) e o linfoma folicular (FL). Por outro lado, o linfoma periférico de células T (PTCL) e o linfoma cutâneo de células T (CTCL), envolvem a linhagem dos linfócitos T e células NK.

Outra forma de classificação, adotada por especialistas, tem em conta a taxa de progressão da doença, diferenciando os linfomas como neoplasias de crescimento lento/indolente, representando 40% dos casos de LNH, e neoplasias de crescimento rápido/agressivo, cerca de 60% como detalhado na Tabela 3. Nesta perspetiva, o DLBCL é o subtipo agressivo mais comum, enquanto FL o subtipo indolente mais predominante. (21)

No caso de LNH de células T e NK, por exemplo, podemos ainda classificá-los quanto à sua extensão, existindo linfomas sistémicos, como é o caso do PTCL, e cutâneos, como o CTCL. Em geral, os linfomas sistémicos acabam por ser mais agressivos, enquanto os cutâneos são indolentes. (21)

O subtipo diagnosticado, indolente/agressivo, determina o tipo de tratamento, pelo que, um diagnóstico preciso é de extrema importância. Linfomas indolentes apresentam linfadenopatia crescente e decrescente por muitos anos, sendo doentes que apresentam menos manifestações. Por outro lado, os linfomas agressivos têm sintomas B específicos, podendo resultar em morte em poucas semanas, caso não sejam tratados. Por vezes, as formas indolentes de LNH transformam-se posteriormente numa forma agressiva da doença. (21,23)

Tabela 3 - Designações de diagnóstico para o LNH adaptado de (21)

Linfomas de células B (85-90%)	Linfomas de células T e NK (10-15%)
Agressivo	Sistémico
Linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) (30%)	Linfoma periférico de células T, (PTCL) (6%)
Linfoma de células do manto (3%)	Linfoma anaplásico sistémico de células grandes (2%)
Linfoma linfoblástico (2%)	Linfoma linfoblástico (2%)
Linfoma de Burkitt (2%)	Linfoma hepatoesplênico de células T
Linfoma primário de grandes células B	Linfoma intestinal de células T associado a enteropatia
Indolente	Cutâneo Primário
Linfoma folicular (FL) (22%)	Linfoma cutâneo de células T (CTCL) (4%)
Linfoma de zona marginal (7%)	Linfoma anaplásico cutâneo primário de células grandes
Leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de pequenas células (7%)	Linfoma subcutâneo de células T semelhante à paniculite
Linfoma do tecido linfóide associado à mucosa gástrica (MALT) (8%)	

4.1.2.2. Etiologia e Fisiopatologia

Os LNHs podem estar associados a diversos fatores, como fatores ambientais, translocações cromossómicas, infeções/inflamações crónicas, imunodeficiência. (22)

Diferentes agentes infecciosos foram associados a LNH, dada a capacidade de induzir estimulação antigénica crónica e desregulação de citocinas, levando à estimulação descontrolada de linfócitos B ou T, proliferação e linfomagenese (21,23):

- O EBV está associado à variante endémica do linfoma de Burkitt;
- O vírus da leucemia de células T humanas tipo 1 causa linfoma de células T;
- O vírus da hepatite C (HCV) resulta em expansões clonais de células B, podendo dar origem a linfoma da zona marginal esplénica e o DLBCL;

- O herpes vírus humano está associado ao linfoma de efusão primário sendo um LNH raro de células B de alto grau associado ao sarcoma de Kaposi;
- A infecção por *Helicobacter pylori* está associada ao desenvolvimento de linfomas gastrointestinais (GI) primários, particularmente linfomas MALT.

Adicionalmente, fatores ambientais como a exposição a produtos químicos, entre os quais, pesticidas, quimioterapia e exposição à radiação, predispõem o desenvolvimento de LNH. Medicamentos como fenitoína, digoxina e antagonistas do TNF também estão associados a esta neoplasia. (22)

Por fim, tanto os estados de imunodeficiência, como doença de imunodeficiência combinada grave ou síndrome de Wiskott-Aldrich, e de inflamação crônica em doentes com distúrbios autoimunes, como síndrome de Sjögren, artrite reumatoide e tireoidite de Hashimoto estão associados a um risco aumentado de LNH. (23)

Em termos fisiopatológicos, este tipo de linfoma desenvolve-se a partir de uma expansão clonal progressiva dos diferentes tipos de linfócitos, decorrentes de uma acumulação de lesões que afetam proto-oncogenes/genes supressores de tumor, resultando na imortalização da célula. Os proto-oncogenes são ativados pela translocação cromossômica e os genes supressores de tumores são inativados pela deleção cromossômica ou mutação. (22,23)

O **DLBCL** tem esta designação graças à sua aparência ao microscópio, apresentando um padrão de crescimento amplo ou difuso, onde, as células malignas de grande tamanho crescem em todo o tecido e não em aglomerados. (21)

Este tipo de tumor pode ainda ser subdividido devido às alterações genéticas que surgem no processo de diferenciação/maturação dos linfócitos B, distinguindo-se os dois subtipos: células B do centro germinativo (GCB) ou células B ativadas (ABC).

Deste modo, o DLBCL GCB expressa genes característicos de linfócitos B do GC, estando associado a translocações genéticas que envolvem a amplificação de BCL-2, bloqueando o processo de morte celular programada. Por outro lado, o subtipo ABC expressa genes normalmente induzidos durante a ativação *in vitro* de linfócitos B do sangue periférico, gerando amplificações frequentes do oncogene SPIB, trissomia recorrente para o cromossoma 3 e ativação da via de sinalização do fator nuclear antiapoptótico (NF)- κ B, o que aumenta a proliferação celular. (24)

Quanto ao **FL**, tal como o nome indica os gânglios linfáticos apresentam-se como folículos de tamanho variável, compactados, contendo pequenas células clivadas sem nucléolos (centrócitos) e células maiores não clivadas com citoplasma moderado, cromatina aberta e múltiplos nucléolos (centroblastos). Origina-se a partir de linfócitos B do GC ou folicular e, a maioria dos casos surge após a translocação genética (14;18)(q32;q21), levando à superexpressão de proteínas antiapoptóticas (BCL-2). (25)

Linfoma **MALT** é um linfoma extranodal da zona marginal, frequentemente, observado no estômago, associado à infeção por *H. pylori*, podendo envolver outra mucosa. A morfologia deste tipo de linfoma reproduz, tipicamente, o tecido linfoide associado à mucosa normal, porém, com folículos reativos contendo células neoplásicas a ocupar a zona marginal. O clone maligno é variável, o tecido envolvido demonstra um infiltrado polimorfo de pequenos linfócitos e células grandes ativadas, que são minoria. (26)

Finalmente, os **PTCLs** são um grupo heterogéneo de distúrbios linfoproliferativos decorrentes de células T maduras (Figura 5). Os subtipos mais comuns têm uma apresentação, predominantemente, nodal e incluem PTCL sem outra especificação (PTCL-NOS), representando cerca de 30% de todos os PTCLs nodais; linfoma angioimunoblástico de células T (AITL); e linfoma anaplásico grande (ALCL), responsável por menos de 5% dos LNH e 12% de todos os PTCLs. (27,28)

PTCL-NOS envolve frequentemente locais nodais e está associado a baixas taxas de sobrevivência global (OS) e de sobrevida livre de eventos em comparação com linfomas agressivos de células B. Estudos de perfil de expressão génica e algoritmos de imuno-histoquímica (IHC) identificaram 2 subgrupos moleculares principais de PTCL-NOS (caracterizados por alta expressão de GATA3 ou TBX21). (27,28)

AITL é a forma clássica do fenótipo TFH (*T-follicular helper*), apresentando-se com linfadenopatia generalizada e estando associada a hipergamaglobulinemia, hepatomegalia/esplenomegalia, eosinofilia, erupção cutânea e febre. AITL também é caracterizada pela presença de linfócitos B positivos para o EBV. (27,28)

Por outro lado, ALCL, subtipo que expressa CD30, está dividido, principalmente, em ALCL ALK+, mais comum em crianças e adultos jovens, sendo é caracterizado pela superexpressão da proteína ALK-1, resultante de uma translocação cromossómica t(2;5) em 40% a 60% dos pacientes, e em ALK-, caracterizado pela presença de rearranjos de DUSP22 e TP63. (27,28)

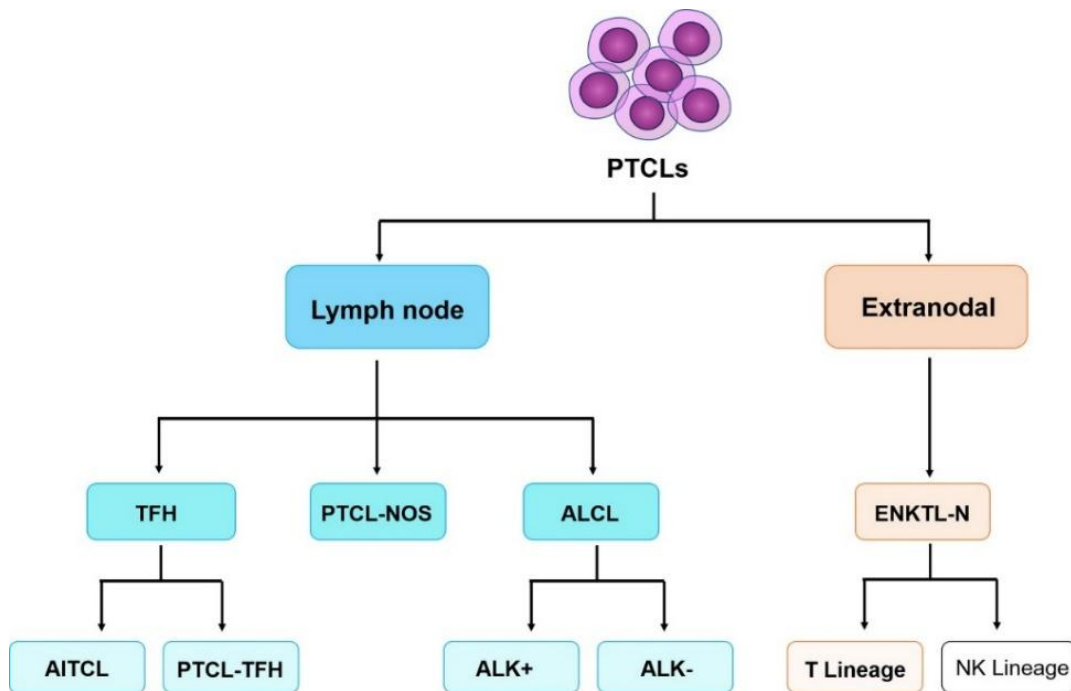


Figura 5 - Classificação dos linfomas de células T periféricos, adaptado de (29)

PTCLs: linfomas de células T periféricos; TFH: célula T *follicular helper*; ALK: cinase de linfoma anaplásico; AITL: linfoma de células T angioimunoblástico; PTCL-TFH, linfoma de células T *follicular helper*; PTCL-NOS: tumor de linfoma de células T periférico sem outra especificação; ALCL: linfoma anaplásico de grandes células; ENKTL-N: linfoma extranodal de células NK.

4.1.2.3. Epidemiologia

O LNH é a neoplasia hematopoiética mais prevalente, estimando-se que representa cerca de 4% de todos os câncros, sendo, frequentemente, diagnosticado a partir dos 55 anos. As exceções passam pelos linfomas linfoblásticos de elevado grau e os pequenos linfomas não clivados, que são mais comuns em crianças e jovens adultos. (22)

Para além disso, dependendo do subtipo, as áreas geográficas mais predominantes também são distintas. Assim, podemos apontar que o FL é mais comum nos países ocidentais, enquanto, linfomas das células T são mais comuns na Ásia. Por outro lado, o linfoma de Burkitt relacionado com o EBV (endémico) é mais comum em África, no entanto, a variante esporádica é recorrente nos USA e na Europa Ocidental. (23)

4.1.2.4. Terapêutica Atual

A terapêutica adotada no LNH baseia-se em diversos fatores, entre os quais, o tipo de LNH, estadió da neoplasia, características histopatológicas e sintomas. Os tratamentos mais comuns incluem quimioterapia, RT, imunoterapia, transplante de células

estaminais e, em casos raros, cirurgia. A imunoterapia, ou seja, rituximab (anti-CD20), é comumente utilizada em combinação com quimioterapia.

Linfoma difuso de grandes células B (DLBCL): Na terapêutica de primeira linha para doentes de baixo risco, ou seja, nos estadios I ou II, o regime frequentemente administrado é o R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona) por 3 a 6 ciclos. Em doentes de elevado risco, onde se inserem os doentes nos estadios III e IV, um ensaio clínico recente demonstrou superioridade de sobrevida livre de progressão (PFS) e redução da necessidade de novas linhas de tratamento quando, no regime R-CHOP, substituímos polatuzumab vedotina pela vincristina. Nestes casos são realizados 6 ciclos de tratamento. (23,30)

Em doenças refratárias poderá ser necessário recorrer a transplantes de medula óssea ou terapia através de células T do recetor de antígeno quimérico (CAR-T). Testes de imagem, como PET, são feitos para avaliar a resposta ao tratamento após 2 a 4 ciclos. (23,30)

Linfoma folicular (FL): Nos estadios iniciais (I e II) a terapêutica preferencial com intenção curativa passa pela RT. No entanto, estudos recentes revelaram que a combinação de RT com quimioterapia com rituximab melhorou a PFS em comparação com a RT isolada, podendo, deste modo, esta combinação proporcionar um melhor equilíbrio entre eficácia e efeitos secundários. (25,31)

Em estadios avançados a terapêutica foca-se na melhoria da qualidade de vida, alívio dos sintomas e reversão de citopenias. Assim, doentes assintomáticos são apenas observados de perto, sem qualquer intervenção, uma vez que, não foram demonstradas alterações significativas na utilização da terapêutica. Por outro lado, anticorpos anti-CD20 (obinutuzumab, rituximab) são combinados com regimes de quimioterapia (CHOP/CVP) para o tratamento de FLs sintomáticos avançados (Figura 6). (25,31)

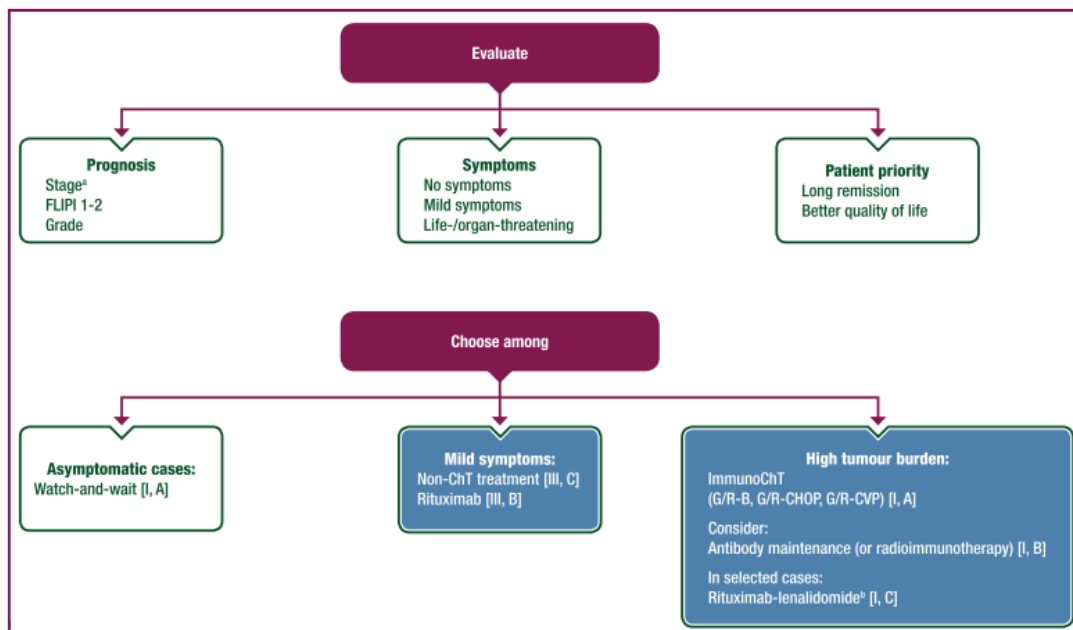


Figura 6 - Algoritmo terapêutico no Linfoma Folicular, adaptado de (31)

B: bendamustina; CHOP: ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona; ChT: quimioterapia; CVP: ciclofosfamida, vincristina, prednisolona; FL: linfoma folicular; FLIPI 1-2: Índice Prognóstico Internacional de Linfoma Folicular 1-2; G: obinutuzumab; R, rituximab.

Linfoma do tecido linfóide associado à mucosa gástrica (MALT): O tratamento de primeira linha é direcionado à erradicação do *H. pylori* com antibióticos, uma vez que, resultou na regressão do linfoma e no controlo da doença a longo prazo na maioria dos pacientes. Frequentemente, adota-se a combinação de inibidores da bomba de prótons (IBPs) com amoxicilina e claritromicina administrados por 10 a 14 dias. No entanto, este regime terapêutico depende da resistência local do *H. pylori* aos antibióticos. (26)

Linfomas periféricos de células T (PTCL): Os regimes de quimioterapia baseados em antraciclina (por exemplo, CHOP ou CHOP + etoposídeo [CHOEP] ou EPOCH com dose ajustada) são os regimes de terapia de primeira linha mais comumente usados porque estão associados a uma tendência na redução da mortalidade. (27)

5. Biomarcadores

Um biomarcador é uma molécula biológica, presente no sangue, noutro fluido corporal ou tecidos, resultante de uma condição fisiológica ou anormal, ou de uma doença. (32)

Neste caso, os biomarcadores tumorais são substâncias produzidas por tumores ou pelas respostas do corpo aos mesmos, durante o processo de génese e progressão, demonstrando possuir valor crítico a diferentes níveis, entre os quais no diagnóstico precoce, previsão de prognóstico e monitorização da eficácia terapêutica. (33)

5.1. Principais Técnicas de Detecção de Biomarcadores

Existem diferentes técnicas de deteção de biomarcadores que, dado a relevância dos biomarcadores, são de extrema importância. Aquelas que mais se destacam, ao nível dos linfomas, passam pela IHC, citometria de fluxo, técnicas de biologia molecular, bem como, técnicas de imagem (Tabela 4).

A IHC é uma técnica frequentemente utilizada quando se trata de diagnósticos baseados em tecidos. Resumidamente, o seu princípio central envolve a deteção localizada de uma proteína com recurso a um anticorpo acoplado com uma enzima que, na presença de substrato, dá origem a um sinal cromogéneo visível por microscopia. (34)

Obter informações relativas às biópsias de pequeno volume tem sido um grande desafio, e, nestes casos, marcadores imunohistoquímicos podem ser muito úteis, particularmente, na avaliação e diagnóstico do cHL, bem como, noutros linfomas morfológicamente semelhantes, como o linfoma de grandes células B rico em células T (THRLBL), onde biópsias de gânglios linfáticos de pequeno volume geralmente representam a fonte de tecido da primeira linha, e o diagnóstico diferencial inclui um processo reativo. (35)

A imunofenotipagem por citometria de fluxo (FCI) é, igualmente, uma ferramenta importante e indispensável no diagnóstico de linfomas de células B maduras, particularmente para pesquisa de pequenas aspirações por agulha fina. A FCI tem várias vantagens, entre as quais análise qualitativa e quantitativa da expressão de múltiplos antígenos em simultâneo. (36) Com isso, provou ser uma técnica superior à IHC, em situações específicas, onde a análise depende da avaliação de um marcador único/duplo,

com uma dose de subjetividade na expressão de antígeno. (37) Para além disso, é uma ferramenta confiável, barata e rápida para estabelecer a origem monotípica ou politípica de uma população de linfócitos B. (38)

O PCR, como técnica molecular, é frequentemente utilizado, por exemplo, em linfomas que estão associados à presença do EBV como biomarcador viral. Deste modo, a monitorização destes subtipos de linfoma é realizada por meio de técnicas de PCR quantitativa (qPCR) aplicadas no sangue total/plasma. (39) Em pacientes com DLBCL, a superexpressão de mRNA livre de oncogenes, incluindo BCL-2, foi demonstrada pela monitorização quantitativa em tempo real de reações de PCR (RT-PCR). Para além destes casos, o PCR é ainda utilizado noutros tipos de linfoma, por exemplo, para quantificar translocações e alterações genéticas. (39)

FISH, hibridização fluorescente *in situ*, uma técnica molecular amplamente aplicada e altamente sensível na deteção de sequências específicas de ácidos nucleicos. É utilizada, com sucesso, para investigar o papel do H2AX, variante de histona fosforilada 2AX em linfócitos B, biomarcador da resposta de reparação do DNA, durante a troca recombinatória na classe de cadeia pesada de imunoglobulina. (40)

Finalmente, a sequenciação de última geração (NGS), oferece uma alternativa molecular atraente devido à maior sensibilidade e ao benefício potencial da caracterização genómica direta e/ou mais ampla. (39) Assim, a NGS poderá ser útil na caracterização de biomarcadores no diagnóstico de invasão do SNC e na previsão do risco de recorrência desta invasão, que advém do diagnóstico de linfomas agressivos. Para isso, estuda-se o DNA derivado do tumor para rearranjos de genes de imunoglobulinas clonotípicos no LCR de pacientes com linfomas. (41)

Para além disso, mais recentemente, a NGS tem sido frequentemente aplicada na deteção e quantificação de DNA tumoral circulante (ctDNA), ferramenta muito útil no estabelecimento do prognóstico e eficácia terapêutica.

Quanto às técnicas de imagem, aquela que tem maior relevância em linfomas é a PET, um tipo de exame de imagem que, ao detetar radiação após a administração de um material radioativo, gera imagens que podem fornecer informações sobre a função de um tecido, ajudando a identificar tecidos alterados. (42) A PET com flúorodesoxiglicose (FDG) surgiu como uma ferramenta importante no estadiamento de pacientes com LH e LNH, pois acrescenta informação significativa aos dados de estadiamento obtidos

usando outros métodos radiográficos padrão. Para além disso, durante o tratamento, a imagem de PET desempenha um papel proeminente nas decisões da terapêutica segundo o estadio. Esta técnica permite ajustes à terapêutica, abreviando o número de ciclos administrados, quando adequado, evitando toxicidades, e fazendo um tratamento adaptado à resposta do doente. (43) Resumidamente, a PET é rotineiramente usada para o estadiamento inicial e avaliação da resposta ao tratamento em pacientes com linfoma. O volume metabólico do tumor é um biomarcador quantitativo baseado em PET que permite a avaliação da carga total da doença, tendo valor de prognóstico em vários subtipos de linfoma. (44)

Tabela 4 - Técnicas de deteção de biomarcadores – Resumo

Técnica	Linfoma	Tipo de Biomarcador	Exemplos
Imunohistoquímica	LH; NLP-HL; DLBCL; FL; PTCL	Diagnóstico e Prognóstico	CD3, CD20, CD30, CD15, PAX5, EBV no diagnóstico de LH. (45)
Imunofenótipagem por Citometria de Fluxo (FCI)	LH; DLBCL; FL; PTCL	Diagnóstico, Prognóstico e Eficácia Terapêutica	CD7: bom prognóstico; CD38: mau prognóstico em PTCL-AITL. (29)
PCR	DLBCL	Prognóstico	Quantificação de MYC como mau fator de prognóstico. (40)
FISH	DLBCL; PTCL	Diagnóstico, Prognóstico e Eficácia Terapêutica	Em ALCL ALK-, rearranjos de DUSP22 revelam um prognóstico favorável e possibilidade de alterar o algoritmo de tratamento. (46)
NGS	LH; DLBCL; FL; PTCL	Diagnóstico, Prognóstico e Eficácia Terapêutica	Em DLBCL e FL mutações em EZH2 indica benefício no tratamento com inibidores de EZH2. (47)

LH: Linfoma de Hodgkin; NLP-HL: Linfoma de Hodgkin predominante em linfócitos nodulares; DLBCL: Linfoma difuso de grandes células B; FL: Linfoma Folicular; PTCL: Linfoma periférico de células T; CD: Cluster de diferenciação; PAX5: *Paired Box 5*; EBV: Vírus Epstein-Barr; AITL: Linfoma angioimunoblástico de células T; ALCL: Linfoma anaplásico grande; ALK: *Anaplastic Lymphoma Kinase*; MYC: *Myelocytomatosis oncogene*; DUSP22: Proteína fosfatase 2 de dupla especificidade; EZH2: Potenciador do *Zeste Homolog 2*.

5.2. Biomarcadores no Diagnóstico de Linfomas

Tendo em conta que, os linfomas são um grupo muito heterogêneo de neoplasias, com características de diagnóstico sobrepostas, tanto a classificação como o próprio diagnóstico podem ser desafiadores. Assim, o desenvolvimento de biomarcadores de diagnóstico veio permitir novas indicações clínicas e patológicas sobre os mecanismos subjacentes à linfomagenese, melhorando o diagnóstico, a subclassificação, estratificação de resultados e terapia personalizada para pacientes com linfoma. (48)

Esta última tem especial relevância, visto que, a heterogeneidade molecular subjacente à agressividade e progressão do linfoma leva a que pacientes que são tratados de forma semelhante tenham resultados variáveis. (48)

5.2.1. Biomarcadores de Diagnóstico no Linfoma de Hodgkin

A diferença diagnóstica no LH está, maioritariamente, evidente entre cHL e NLP-HL. Salvo algumas exceções, como LRHL, os biomarcadores do cHL são semelhantes entre os subtipos desta classe, sendo que as diferenças entre estes são, maioritariamente, morfológicas. Dada a sua incidência, biomarcadores de diagnóstico do cHL têm especial relevância, podendo estes ser moleculares, genéticos, epigenéticos, imunohistoquímicos, bem como, alterações no RNA.

5.2.1.1. Biomarcadores de Alteração Genética

O **linfoma de Hodgkin clássico** caracteriza-se pelas células de HRS, sendo que, um possível cenário para que estas células se desenvolvam partindo de células B GC mutadas ao nível dos genes da região variável da Ig, é a capacidade de escapar a eventos apoptóticos, nomeadamente, a partir de alterações genéticas (Tabela 5). (49)

Mecanismos que contribuem para a sobrevivência destas células passam pela perda da maioria das proteínas de superfície das células B, derivado do silenciamento epigenético dos reguladores do programa dos linfócitos B, à hipermetilação do promotor e à sobre-regulação de ID2, NOTCH1, ABF1 e STAT5, antagonistas da transcrição que suprimem a expressão génica de linfócitos B. (49,50) Aliado a estas características moleculares, incluindo a perda do BCR que leva à apoptose nas células B maduras, a sobrevivência depende de múltiplas alterações genéticas, como a ativação

constitutiva das vias de sinalização NF- κ B e JAK-STAT. (50) Assim, as vias do NF- κ B são ativadas através de mecanismos que englobam mutações em reguladores negativos (TNFAIP3, NFKBIE, NFKB1A), bem como amplificações, ganhos cromossômicos e rearranjos estruturais que afetam os *loci* genéticos para MAP3K14, REL e BCL-3 e levam a um aumento da sua atividade. (50) Lesões genéticas menos frequentes passam pela inativação/deleção de CYLD e TRAF3. (49)

As mutações TNFAIP3 e NFKB1A são mais frequentes em cHL não infetado por EBV, indicando que em casos positivos para EBV, o LMP1 viral, um forte ativador de NF- κ B, pode substituir a necessidade de inativar TNFAIP3/NFKB1A. (49) Assim, em casos de EBV+, existem duas proteínas de membrana latentes que são expressas, LMP1 e LMP2a. LMP1 imita um recetor CD40 ativo, e LMP2a imita a sinalização BCR, podendo resgatar células B GC incapacitadas por BCR da apoptose ao promover a atividade PI3K/AKT, contribuindo para o desenvolvimento de cHL EBV+ pela indução de alterações transcricionais semelhantes às células HRS. (49,51)

TARC é outro biomarcador, expresso em altas concentrações no cHL, produzido por células HRS e por células apresentadoras de antígeno. A sua secreção, bem como, a de outras citocinas como interleucinas faz com que se inicie a sinalização JAK/STAT a jusante, o que leva à secreção de STAT6, que tem como consequência o aumento da secreção de TARC. (52) Por outro lado, esta estimulação pode ser mais evidente por alterações genéticas como a amplificação do gene JAK2 (9p24.1) e por mutações/deleções em reguladores negativos (SOCS1 e PTPN11). (49)

Outras vias importantes desreguladas no cHL incluem a NOTCH e a PI3K-AKT. (50) A este respeito, mutações em ITPKB, que codifica inositol-trifosfato 3-quinase B de uma quinase que promove a sinalização AKT, são detetadas em 13–40% dos casos. Adicionalmente, mutações disruptivas no gene GNA13 que codifica a subunidade alfa-13 da proteína G contribuem ainda mais para a atividade AKT, ao interromper a sinalização do recetor por meio de S1PR2 e P2RY8. (49) Estas mutações GNA13 foram identificadas principalmente em cHL EBV-negativo.

Lesões genéticas que afetam a evasão das células HRS, incluem os genes PD-L1 e PD-L2 em 9p24.1, dado que, a sua sobreexpressão fornece um importante mecanismo imunossupressor, visto que, ao se ligarem a PD-1, inibem a atividade de linfócitos T citotóxicos e outras células imunes que expressam PD-1. (49)

Por outro lado, alterações nos complexos MHC I/II também tem implicações na evasão destas células. Assim, mutações inativadoras em β 2-MG prejudicam a expressão de MHC I e o reconhecimento de células HRS por linfócitos T CD8+. Por sua vez, aberrações do gene CIITA prejudicam a expressão de MHC classe II. (49)

Deleções/mutações inativadoras também foram encontradas para o gene CD58, que é vantajoso para células HRS escaparem de um ataque de células NK. Genes adicionais são frequentemente afetados por lesões genéticas em células HRS: ARID1A, TNFRSF14 e XPO1. ARID1A é parte de um complexo de remodelação da cromatina e um supressor de tumor em vários tipos de malignidades sólidas e hematológicas; TNFRSF14 membro da superfamília do recetor do fator de necrose tumoral (TNFR) é frequentemente mutado em várias formas de linfomas de células B, e a inativação deste recetor inibitório promove a proliferação de células B e a sobrevivência de linfócitos B GC; Exportina 1 (XPO1) é um recetor de exportação nuclear que medeia a translocação de vários RNAs e proteínas do núcleo para o citoplasma, afeta o codão 571 (E571K), apontando para um efeito de ganho de função da mutação. (49) Estudos genômicos mais recentes mostraram que os casos de cHL refratária apresentam mutações no TP53, bem como mutações nos reguladores epigenéticos EP300 e CREBBP. (50)

Quanto ao **NLP-HL**, cujas células características são as *Lymphocyte Predominant (LP) cells*, também são conhecidas algumas alterações genéticas, sendo que o perfil de expressão genética mostrou uma estreita relação entre as células neoplásicas de NLP-HL e cHL. À semelhança das células HRS, as células LP adquirem, frequentemente, ganhos de REL e atividade da via NF- κ B constitutiva, porém lesões genéticas envolvendo TNFAIP3 ou NFKBIA estão ausentes/são raras em células LP. Mutações em SOCS1 foram encontradas em cerca de 50% dos casos de NLP-HL, implicando um papel importante da atividade JAK/STAT também nesta forma de LH. (49,53)

Adicionalmente, as células LP carregam translocações BCL-6 que envolvem *loci* Ig, tendo sido reportadas em aproximadamente metade dos casos de NLP-HL. Para além disso, mutações nos genes SGK1, DUSP22 e JUNB, são recorrentes, no entanto os seus mecanismos necessitam de ser mais aprofundados. (49,51)

Tabela 5 - Alterações genéticas cHL adaptado de (50)

Evasão Imune	JAK-STAT	NF-κB
Amplificação	Ganho de Função	Perda de Função
PDL-1/2	JAK1; JAK3	TNFAIP3
Perda de Função	STAT3; STAT5B; STAT6	NFKBIE; NFKB1A
TNFRSF14; CD58; β2-MG	Perda de Função	Amplificação
CIITA (translocação)	SOCS1; PTPN11	MAP3K14
NOTCH	Amplificação	REL
NOTCH 1; NOTCH 2	JAK2	BCL3
PI3K-AKT		
GNA13; ITPKB		

PDL: Ligante de proteína/s de morte celular programada; TNFRSF14: Membro da superfamília 14 do recetor do fator de necrose tumoral; CD: Cluster de diferenciação; β2-MG: β2-microglobulina; CIITA: Transativador Classe II; NOTCH: Reguladores da hematopoiese e da diferenciação das células imunológicas; PI3K-AKT: Via de sinalização fosfoinositídeo 3-quinase; GNA13: Subunidade da Proteína G Alfa 13; ITPKB: Inositol-Trisfosfato 3-quinase B; JAK: Janus *kinase*-; STAT: Transdutor de sinal e ativador da transcrição; SOCS1: Supressores de sinalização de citocinas; PTPN11: Proteína tirosina fosfatase não recetora 11; NF-κB: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; TNFAIP3: Gene da proteína induzida pelo fator de necrose tumoral alfa; MAP3K14: Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno; REL: Proto-oncogene; BCL: Proto-oncogene inibidor da apoptose.

5.2.1.2. Biomarcadores Imunohistoquímicos/ de Imunofenótipo

O cLH caracteriza-se por um perfil imunofenótipo, na sua maioria, semelhante entre os subtipos, expressando certos antígenos em células neoplásicas. (54)

De acordo com dados atuais, o cHL é caracterizado por um imunofenótipo comum com expressão positiva de CD15+, CD30+, PAX-5+ (expressão fraco) e, tipicamente, negatividade para CD3-, CD20-, CD45-, CD79a-.

A fraca positividade para PAX-5, pode ser explicada por múltiplos fatores como, silenciamento epigenético de genes de linfócitos B, regulação positiva de fatores de transcrição que suprimem a expressão do gene de células B (por exemplo, ID2) e regulação negativa/perda de fatores de transcrição do gene de linfócitos B (por exemplo, BOB1, OCT2, PU.1). Este último mecanismo também explica a evasão das células HRS à apoptose. (54)

De acordo com a literatura, a expressão de BOB1 é relatada em mais de 50% das células HRS em casos de cHL, no entanto, a expressão de OCT2 parece ser menos frequente. Porém, a co-expressão de ambos os marcadores parecem ser mais recorrentes do que o que se pensava, o que veio dificultar a distinção entre cHL e NLP-HL, visto que, OCT2 (em particular) e BOB1 são considerados bons marcadores para destacar as células LP. Recentemente, novos marcadores de cadeia J e MEF2B demonstraram ser altamente sensíveis e específicos de NLP-HL vs cHL, e talvez de maior utilidade do que OCT2 e BOB1 na diferenciação entre ambos os linfomas. (54,55)

O CD20, pelo contrário, parece ser completamente negativo em cerca de 70% dos casos em células HRS. Os restantes 30%, em que encontramos uma positividade fraca e variável do CD20 em HRS, pode ser confundido com imunoblastos B, o que gera um grande desafio na distinção entre ambas as células. Não obstante, em casos extremamente raros de cHL, o CD20 pode ainda ser expresso forte e uniformemente, em casos EBV+. No entanto, nestes casos sugere-se o alerta para a possibilidade de ser um DLBCL, sendo assim, útil fazer a procura por todos os biomarcadores, incluindo anticorpos específicos de linfócitos B. Recentemente, o GATA3 demonstrou ser útil na diferenciação de cHL vs DLBCL, sendo o primeiro tipicamente positivo para expressão de GATA3 e o último tipicamente negativo. (54)

Quanto à expressão de marcadores de linfócitos T, embora o cHL seja, geralmente, negativo para a expressão dos mesmos, a sua positividade foi encontrada em cerca de 20% dos casos, envolvendo marcadores como CD2 e CD4, sendo menos comum a expressão de CD3. Pela sua raridade, este diagnóstico apresenta vários desafios, principalmente, pela sua semelhança imunofenotípica com o ALCL ALK-. Uma panóplia de biomarcadores, incluindo PAX-5, CD15, CD20, RNA codificado por EBV (EBER) e marcadores citotóxicos (como TIA1, granzima B e perforina) pode ser sugerida para distinguir entre as duas entidades, uma vez que, por exemplo, o ALCL, ao contrário do cHL, é tipicamente negativo para PAX-5 e CD15 e pode expressar marcadores citotóxicos. (54)

O cHL e o **NLP-HL** são ambos derivados das células B do GC; no entanto, possuem características biológicas distintas que se traduzem em imunofenótipos característicos. As células LP em NLP-HL exibem um programa de linfócitos B com expressão de CD20, OCT2 e BOB1, ao contrário do cHL. Para além disso, o seu fenótipo usual

caracteriza-se pela expressão positiva de CD20+, C45+, CD79a+, BCL6+ e PAX-5+ e é negativo para CD3-, CD15- e CD30-.

Assim, a realização de estudos imunohistoquímicos e a utilização de um conjunto adequado de anticorpos, como CD15, CD20, CD30 e PAX-5, bem como a hibridização *in situ* para o EBER, são úteis para distinguir com sucesso estas duas entidades na maioria das vezes. (53)

No entanto, permanece uma exceção entre a diferenciação de cHL e NLP-HL, que se centra no facto de LRCHL ter características intermediárias entre NLP-HL e os restantes subtipos de cHL, nas quais podem exibir padrões imunofenotípicos parcialmente sobrepostos (Tabela 6). (56)

Tabela 6- Distinção fenotípica entre cHL, LRCHL e NLP-HL adaptado de (56)

cHL	LRCHL	NLP-HL
Fenótipo de HRS	Fenótipo de HRS	Fenótipo de LP
CD30+; CD15+	CD30+; CD15+/-	CD30-; CD15-
CD20 usualmente -	CD20 +/-	CD20+
PAX-5 (baixa intensidade)	PAX-5	PAX-5
Infeção EBV +/-	Infeção EBV +/-	Infeção EBV-

HRS: Células malignas de Hodgkin e Reed–Sternberg; CD: Cluster de diferenciação; PAX-5: *Paired Box 5*; EBV: Vírus Epstein-Barr; LP: *Lymphocyte Predominant*.

5.2.2. Biomarcadores de Diagnóstico no Linfoma não-Hodgkin

5.2.2.1. Biomarcadores de Alteração Genética

A grande maioria de LNH são associados a linfócitos B com alterações nos mecanismos genéticos que ocorrem ao nível do GC. (51) Quanto ao perfil genético de linfomas de células T também tem especial importância na definição do diagnóstico. (46)

Linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) é o LNH mais recorrente. Com base no perfil de expressão genética, o DLBCL é constituído por dois subtipos distintos: GCB e ABC. (51)

Uma das principais diferenças passa pela ativação descontrolada da via de sinalização NF-κB observada no subtipo ABC, mas não nos casos de GCB. (51) Esta ativação

caracteriza-se por uma fração significativa de mutações oncogênicas em genes. (57) Assim, o aumento da atividade NF- κ B em ABC-DLBCL é estimulado por mutações em CARD11, uma parte do complexo CBM (CARD11, BCL-10 e MALT1), bem como, continuamente, ativada pela estimulação "crônica" do BCR, e mutações somáticas de duas subunidades BCR (i.e., CD79A e CD79B). (51)(57)

Em mais de metade dos casos de ABC-DLBCL, verificou-se deleções ou mutações inativadoras no gene supressor tumoral TNFAIP3 (A20), para além disso, mutações oncogênicas de MYD88, que levam à ativação constitutiva da via de sinalização JAK-STAT, também foram observadas com muita frequência. (51) Assim, MYD88 foi escolhido como uma mutação crítica no subtipo ABC-DLBCL, enquanto XPO1 foi escolhido como uma mutação essencial em GCB-DLBCL. (58)

O STAT3 é um fator de transcrição que regula genes envolvidos na proliferação, angiogênese, supressão da apoptose, bem como, controlo do ciclo celular, pela expressão de MYC. Em DLBCL, STAT3 demonstrou promover resistência apoptótica no subtipo ABC agressivo, uma vez que, níveis mais elevados de mRNA de STAT3 foram encontrados em ABC. Assim, STAT3 está associado à expressão de MYC que promove a apoptose. (59) No entanto, no GCB-DLBCL, a translocação t(8;14) (q24;q32) também é frequentemente observada envolvendo o rearranjo do gene MYC, o que prejudica sua regulação normal e resulta na sua regulação positiva. (57)

A BCL-2 promove a sobrevivência celular por meio da inibição da apoptose. Por outro lado, MYC, regulador do metabolismo e proliferação celular, é ativado por um grande número de vias oncogênicas, estimulando muitas alterações genéticas que resultam em malignidades. Este, regula negativamente BCL-2 durante a apoptose e regula a expressão de genes associados à proliferação celular. (57)

Recentemente, foi ainda identificado um novo proto-oncogene, TCF4, que se localiza no *locus* 18q21.2, adquirido, recorrentemente, em casos de ABC. A sobreexpressão deste proto-oncogene, mostrou ativação transcricional direta dos genes MYC e IGHM. (51)

Entre outros dos genes afetados no DLBCL, o BCL-6 está entre os genes mais recorrentes. O bloqueio aberrante na função repressiva do BCL-6 é conhecido por contribuir para a instabilidade genética, levando, em última análise, à transformação neoplásica. Para além disso, o BCL-6 autorregula a sua própria expressão, bem como, regula, indiretamente, a expressão de certos genes como o PRDM1 cuja expressão é

necessária para a diferenciação terminal de células B GC em células plasmáticas. O PRDM1 é frequentemente inativado especificamente em ABC-DLBCL. (57) Assim, o BCL-6 é um fator de transcrição que reprime a transcrição genética em linfócitos B do GC por meio do recrutamento de proteínas co-repressoras, inibindo as vias de resposta a danos no DNA e, portanto, previne a apoptose dos ciclos celulares. (51)

Por sua vez, alterações genéticas críticas detetadas apenas nos casos de GCB-DLBCL, passam por mutações pontuais que afetam EZH2 no resíduo Tyr641. Estas mutações aumentam a trimetilação do H3K27, e esta modificação da cromatina pode ser responsável pelo silenciamento de genes supressores de tumor. (51) Para além disso, mTORC1 pode ser ativado de forma aberrante em GCB-DLBCL através da ativação de mutações dos genes da via PI3K/Akt/mTOR. (60)

Como forma de conseguir diferenciar cada tipo de DLBCL, em termos genéticos, foi criada uma nomenclatura de subtipos, onde MCD representa os casos mutados MYD88, L265P e CD79B; BN2 para genes de fusão BCL-6 ou casos com mutação NOTCH2; N1 para os casos com mutação NOTCH1; e EZB para casos com mutação EZH2 ou translocação de BCL-2. (51,58) Desta subdivisão ainda surgiram novos subtipos, tal como ilustrado na Figura 7, com expressões genéticas distintas (Tabela 7).

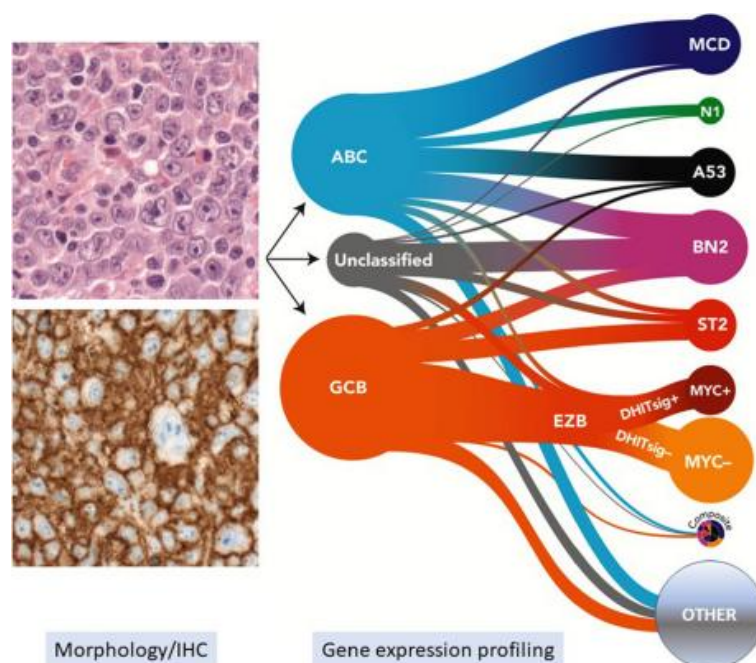


Figura 7 - Correlação entre subtipagem morfológica/IHC e perfis de expressão génica em linfomas difusos de grandes células B, adaptado de (61). À esquerda são apresentadas as características morfológicas dos subtipos ABC e GCB. À direita, estes são divididos dentro dessas categorias de acordo com a sua expressão genética em: MCD, N1, A53, BN2, ST2, EZB MYC+ e EZB MYC-.

Tabela 7 - Principais alterações genéticas de acordo com o subtipo de DLBCL adaptado de (61)

Subtipo DLBCL	Subtipo Genético	Principais Alterações Genéticas
ABC	MCD	Mutação em MYD88 e CD79B
ABC	N1	Mutação em NOTCH1
ABC	A53	Inativação/Aneuploidia de TP53
Não Classificado	BN2	Translocação de BCL-6 e Mutação em NOTCH2
GCB	ST2	Mutação em SGK1 e TET2
GCB	EZB-MYC+	Mutação em EZH2: Translocação de MYC e Mutação em DDX3X
GCB	EZB- MYC-	Translocação de BCL-2: Inativação de TNFAIP3 e Mutação em CARD11

ABC: Células B ativadas; GCB: Células B do centro germinativo; MYD88: Fator de diferenciação mieloide 88; CD: Cluster de diferenciação; NOTCH: Reguladores da hematopoiese e da diferenciação das células imunológicas; TP53: Proteína supressora de tumor p53; BCL: Proto-oncogene inibidor da apoptose; SGK1: Quinase 1 regulada por soro e glicocorticoide; TET: *Ten-Eleven Translocation*; EZH2: Potenciador do *Zeste Homolog 2*; MYC: *Myelocytomatosis oncogene*; DDX3X: *DEAD-Box Helicase 3 X-Linked*; TNFAIP: Gene da proteína induzida pelo fator de necrose tumoral alfa; CARD11: Família 11 do domínio de recrutamento de caspase.

Quanto ao **linfoma folicular (FL)**, o LNH indolente mais recorrente, geneticamente, tem uma alteração comum em cerca de 90% dos seus casos. Trata-se da translocação cromossômica t(14;18)(q32;q21), na qual a região intensificadora da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) em 14q32 e o gene BCL-2 em 18q21 são justapostos. (58) Esta translocação contribui para o desenvolvimento de FL através da inibição da apoptose devido à expressão elevada e irregular do gene antiapoptótico BCL-2. (51)

Adicionalmente, estudos subsequentes identificaram alterações genéticas secundárias que permitem a caracterização deste tipo de linfoma, revelando mutações relacionadas com a linfomagenese em genes das vias de sinalização JAK-STAT e NF-κB, bem como, em genes envolvidos na modificação pós-traducional de histonas. (51,62)

Alterações genômicas em enzimas modificadoras de histonas, incluindo KMT2D (63,4%), CREBBP (57,5%), EP300 (9%) e EZH2 (25%), são detetadas em

praticamente todos os pacientes com FL. (58,62,63) Isto compromete a sua acetilação, bem como, mecanismos de transcrição do DNA.

Para além disso, o regulador transcricional BCL-6 é alterado em 5-10% dos casos de FL e mutações no ativador transcricional MEF2B, envolvido no recrutamento de desmetilases e desacetilases para promotores e intensificadores, estão presentes em 12–15% dos pacientes. Esta alteração modifica a capacidade do MEF2B se ligar ao DNA ou ao co-repressor CABIN1, levando ao aumento da atividade transcricional. (62)

As alterações genéticas que codificam para proteínas na via de sinalização BCR/NF- κ B (CARD11, TNFAIP3, CD79A, CD79B e MYD88) estão presentes em aproximadamente 30% dos pacientes. Mutações somáticas BTK e FOXO1 são encontradas em cerca de 5–10% dos casos de FL. (62)

São ainda relevantes os genes envolvidos nas vias de sinalização JAK-STAT (SOCS1, STAT6, STAT3) e NOTCH (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, DTX1 e SPEN), uma vez que, são frequentemente alterados, promovendo a proliferação e a sobrevivência das células tumorais, de acordo com o descrito na Figura 8.

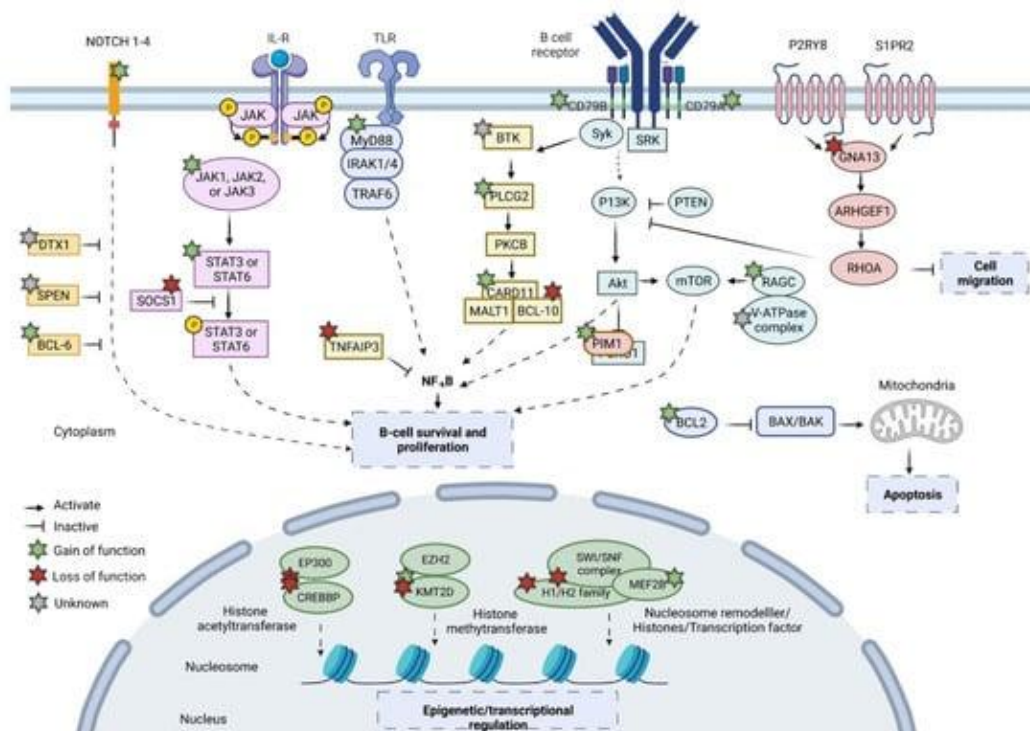


Figura 8 - Vias moleculares e alterações genéticas desreguladas no linfoma folicular adaptado de (62). As alterações que resultam em ganho de função são indicadas por estrelas verdes, enquanto as mutações de perda de função são assinaladas com estrelas vermelhas. Estrelas cinzentas indicam alterações de função ainda não completamente compreendidas. De entre as diferentes vias podemos encontrar uma ativação aberrante da via JAK-STAT (especificamente JAK1/2/3 e STAT3/6), causada por mutações em genes como SOCS1 ou TNFAIP3, promovendo a proliferação celular. Por outro lado, a via do BCR e TLR, que depende da proteína adaptadora MYD88, contribuem para a ativação da via NF-κB e estimulam a sobrevivência. Paralelamente, temos também a via NOTCH, regulada por genes como SPEN e DTX1, bem como, o aumento de BCL-2, que inibe a via apoptótica. Alterações em componentes epigenéticos e reguladores da cromatina como as histonas, afetam a regulação transcricional e contribuem para a transformação maligna.

No **linfoma do tecido linfóide associado à mucosa gástrica (MALT)**, translocações cromossômicas são frequentes, existindo prevalência de 4 alterações genéticas: $t(11;18)(q21;q21)/BIRC3-MALT1$, $t(1;14)(q22;q32)/BCL10-IGH$, $t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1$ e $t(3;14)(q31;q32)/FOXP1-IGH$. (64,65)

Todas as translocações acima mencionadas exercem atividade oncogênica ativando a via NF-κB, o que leva à expressão de vários genes para sobrevivência e proliferação celular. Entre as translocações, $t(11;18)(q21;q21)/BIRC3-MALT1$, é a mais comum, sendo detetada em 15-30% dos casos de linfoma MALT, geralmente ao nível do pulmão e estômago. Está associada à ausência de *H. pylori*, pelo que os casos positivos para esta translocação não respondem à erradicação deste microrganismo. (64,65) O $t(14;18)(q32;q21)$ é a segunda translocação mais comum no linfoma MALT, sendo visto em 5–20% dos linfomas MALT, especialmente no fígado, pele, pulmão e anexos

oculares. Quanto à translocação t(1;14)(p22;q32) está presente apenas em 1–2% dos linfomas MALT, podendo ser vista ao nível do pulmão e estômago. (64) Finalmente, t(3;14)(p14.1;q32), com rearranjo de IGH e FOXP1, é encontrado em aproximadamente 10% dos linfomas MALT, principalmente em casos que surgem na tireoide, anexos oculares e pele. (64)

Para além disso, o panorama mutacional também é muito vasto e inclui genes como TNFAIP3, CREBBP, KMT2C, TET2, SPEN, KMT2D, LRP1B, PRDM1, EP300, TNFRSF14, NOTCH1/NOTCH2 e β 2-MG. (64)

O gene TNFAIP3 (A20), é um importante inibidor de NF- κ B. Mutações/deleções de A20, que levam à inativação desta, são frequentes em linfomas MALT dos anexos oculares, glândulas salivares, tireoide e fígado como representado na Figura 9. (65)

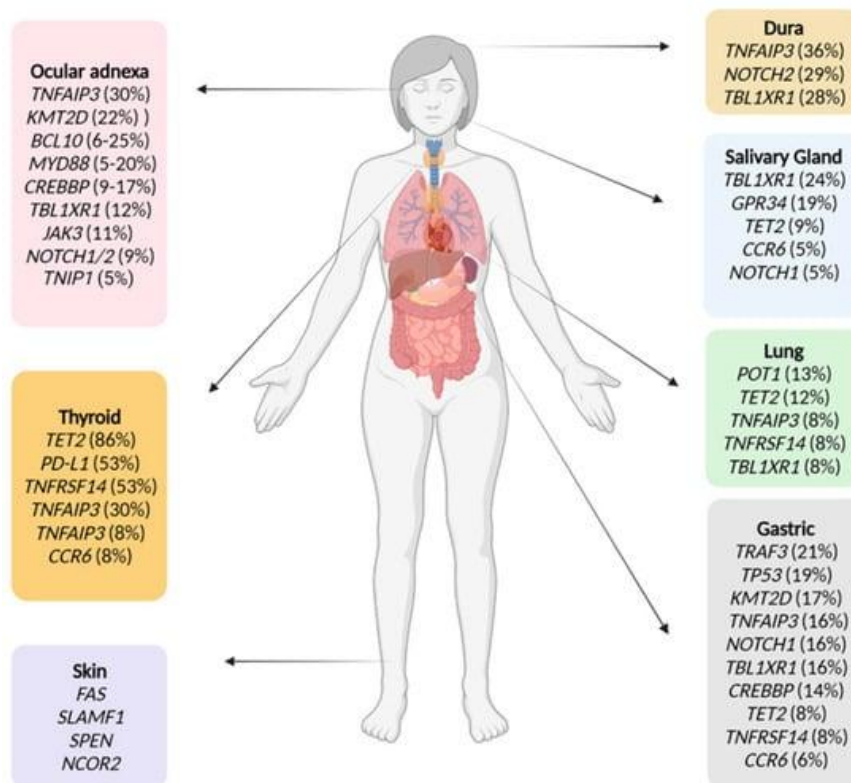


Figura 9 - Genes mutados em linfoma MALT de acordo com o local de origem adaptado de (64). São destacados os locais onde o linfoma MALT é mais frequente, acompanhados das mutações genéticas predominantes, onde, no estômago, por exemplo, são comuns mutações TRAF3, TP53 e KMT2D, enquanto na tireoide predominam alterações em TET2 e PDL-1. Nos tecidos do pulmão, glândulas salivares, dura-máter, pele e anexos oculares, há padrões distintos de mutações, com destaque para genes como TNFAIP3, TBL1XR1, NOTCH1/2, CREBBP e GPR34. Esta diversidade genética reforça a influência do microambiente tecidual na patogênese do linfoma MALT, podendo ter implicações terapêuticas importantes.

Por sua vez, este tipo de linfoma tem genes altamente alterados de imunoglobulinas de cadeia pesada variável (IGHV), como por exemplo linfomas MALT da glândula salivar onde se verifica distorção ao nível das IGHV1-69/J4 (55%)/ IGHV3-7/J3 (15%). Por outro lado, IGHV4-34 (18%) é frequentemente usado no linfoma MALT anexial. (64)

No caso de **linfomas periféricos de células T** (PTCL), em PTCL-NOS, podemos dividir a sua expressão genética com base na expressão de GATA3 e dos seus genes alvo (CCR4, IL18RA, CXCR7) ou de TBX21 e dos seus genes alvo (EOMES, CXCR3, IL2RB, CCL3, IFN γ). (66) Quanto ao subtipo relacionado com a expressão de GATA3, julga-se derivar de células Th1, enquanto o segundo tipo deriva de Th2. (67) PTCL-GATA3 exibiu maior complexidade genómica caracterizada pela perda/mutação frequente de genes supressores de tumor visando o eixo CDKN2A/B-TP53, vias PTEN-PI3K e RB1, junto com ganhos/amplificações de STAT3 e MYC. PTCL-TBX21, mostra mutações frequentes em CMG, como TET1, TET3 e DNMT3A. (67,68)

Relativamente a AITL, mutações somáticas recorrentes nos reguladores epigenéticos TET2, IDH2 e DNMT3A foram detetadas, indicando que as aberrações epigenéticas são um dos principais impulsionadores da linfomagénese. Para além disso, estudos confirmam elevada prevalência da mutação específica p.Gly17Val na pequena GTPase RHOA, bem como, foram descritas mutações recorrentes em CD28. (28,69)

ALCL, subdivide-se em ALK-positivo e negativo, sendo geneticamente diferentes. Em ALCL ALK+, caracterizado pela sobreexpressão da proteína ALK-1, resultante de uma translocação cromossómica t(2;5)(p23,q35), existe predominância em rearranjos cromossómicos ao nível do gene NPM1, seguido de TPM3, ATIC. (28,66,68)

Os ALCLs ALK-, não têm rearranjos ALK, no entanto, dois rearranjos cromossómicos com significância clínica foram identificados: DUSP22, no cromossoma 6p25.3, em cerca de 30% dos ALCLs ALK-, bem como, cerca de 8%, tem rearranjos de TP63 no cromossoma 3q28. Outras mutações comuns envolvem os genes TYK2 ou ROS1 e contribuem para a ativação de JAK-STAT3. (66,68) Alterações genéticas em TP53, JAK1, STAT3, PRDM1, KMT2D, KRAS, TET2 e NOTCH1, podem ser descritas. (66)

Em suma, na Tabela 8 podemos observar um resumo do perfil genético dos LNH.

Tabela 8 - Perfil genético dos linfomas não-Hodgkin adaptado de (28,51,58)

Tipo de Linfoma	Perfil Genético
DLBCL subtipo GC	BCL-2; BCL-6; MYC; EZH2; SGK1
DLBCL subtipo ABC	CARD11; CD79A; CD79B; TNFAIP3 (A20); MYD88; TCF4; PRDM1
Linfoma Folicular	BCL-2; KMT2D; CREBBP; EP300; EZH2; MEF2B; CARD11; TNFAIP3; STAT6; NOTCH2
Linfoma MALT	BIRC3; MALT1; BCL10; FOXP1; TNFAIP3; CREBBP; SPEN, KMT2D, PRDM1; TNFRSF14; NOTCH1/2
PTCL-NOS GATA3	CCR4 ; IL18RA; CXCR7; TP53; PRDM1; CDKN2A/B; RB1; PTEN; STAT3; MYC
PTCL-NOS TBX21	EOMES; CXCR3; IL2RB; CCL3; IFN γ ; TET1; TET3; DNMT3A
PTCL-AITL	TET2; DNMT3A; RHOA; IDH2; CD28
PTCL-ALCL ALK +	NPM1; TPM3; ATIC
PTCL-ALCL ALK -	DUSP22; TP63; TYK2; ROS1

DLBCL: Linfoma difuso de grandes células B; GC: Centro germinativo; BCL: Proto-oncogene inibidor da apoptose; EZH2: Potenciador do *Zeste Homolog 2*; SGK1: Quinase 1 regulada por soro e glicocorticoide; ABC: Células B ativadas; CARD11: Família 11 do domínio de recrutamento de caspase; CD: Cluster de diferenciação; TNFAIP3: Gene da proteína induzida pelo fator de necrose tumoral alfa; MYD88: Fator de diferenciação mieloide 88; TCF4: Fator de transcrição 4; PRDM1: Proteína-1 de maturação induzida por linfócitos B; KMT2D: Histona-lisina N-metiltransferase 2D; CREBBP: Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; EP300: Proteína p300 de ligação à região inicial do adenovírus; MEF2B: Fator de ligação do potenciador de miócitos 2B; STAT: Transdutor de sinal e ativador da transcrição; NOTCH: Reguladores da hematopoiese e da diferenciação das células imunológicas; PTCL: Linfoma periférico de células T; NOS: Sem outra especificação; GATA3: Fator de transcrição de importante na proliferação, desenvolvimento e diferenciação celular; CCR4: Recetor 4 de quimiocinas com ligação C-C; IL: Interleucina/s; CXCR: Recetores de quimiocinas CXC; TP53: Proteína supressora de tumor p53; CDKN2A: Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A; RB1: Retinoblastoma 1; PTEN: *Phosphatase and Tensin Homolog*; MYC: *Myelocytomatosis oncogene*; TBX21: Fator de Transcrição T-Box 21; EOMES: Gene codificador de proteínas Eomesodermina; CCL3: Ligante 3 de quimiocinas com ligação C-C; IFN γ : Interferão gama; TET: *Ten-Eleven Translocation*; DNMT3A: DNA (citosina-5)-metiltransferase 3 alfa; AITL: Linfoma angioimunoblástico de células T; RHOA: Membro da família homóloga Ras A; IDH2: Isocitrato Desidrogenase 2; ALCL: Linfoma anaplásico grande; ALK: *Anaplastic Lymphoma Kinase*; NPM1: Nucleofosmina 1; TPM3: Tropomiosina 3; ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferase; DUSP22; TP63 Proteína supressora de tumor p63; TYK2 Tirosina quinase 2; ROS1: Recetor tirosina quinase.

5.2.2.2. Biomarcadores Imunohistoquímicos/ de Imunofenótipo

Na classificação atual da OMS de tumores de tecidos hematopoiéticos e linfoides, o **linfoma difuso de grandes células B (DLBCL)** consiste em DLBCL, não especificado de outra forma (DLBCL-NOS) e várias variantes específicas. (45)

Imunohistoquimicamente, DLBCL-NOS é caracterizado como linfócitos grandes, atípicos, CD3- e CD20+ com um índice Ki-67 >80%. Para além disso, algoritmos como o de Hans são, atualmente, utilizados para definir o imunofenótipo dos diferentes tipos de DLBCL, utilizando biomarcadores como CD-10; BCL-6; MUM-1/IRF-4. (45,70)

CD10 é um marcador normalmente expresso em centroblastos e centrócitos de GC reativos. Portanto, de acordo com o algoritmo de Hans, o tumor é classificado como tipo de GCB se houver >30% da população de células tumorais CD10-positivas, independentemente dos resultados dos outros marcadores. (45)

Relativamente ao marcador MUM-1/IRF-4, a sua expressão em células tumorais descreve a etapa final da diferenciação dos linfócitos B do GC, com subsequente maturação para células produtoras de anticorpos, sendo normalmente expresso em células plasmáticas ou pós-GC, portanto, a expressão de MUM-1 em DLBCL sugere a possibilidade de um tipo de ABC não-GCB (45,70)

À semelhança do CD-10, a BCL-6 é uma proteína que regula negativamente a transcrição na célula e é geralmente expressa em GCB, bem como em muitos ABC-DLBCLs. Portanto, quando a expressão de BCL-6 é positiva ($\geq 30\%$), é classificado como GCB apenas quando a expressão de MUM-1 é negativa ($< 30\%$). (45,70)

Assim, de um modo geral, os dois tipos de DLBCL, GC e não-GC, podem ser definidos da seguinte forma: CD10-/BCL-6-/MUM1+ para DLBCL não-GC e CD10+/BCL-6+/MUM1- para DLBCL GC. (71)

No **linfoma folicular (FL)**, a característica imunohistoquímica mais marcada é a co-expressão de CD-10 e BCL-2. Tal como em DLBCL, a expressão de CD-10 deve-se à origem das células tumorais nos centrócitos e centroblastos do GC, no entanto, BCL-2 deveria ser negativo nestas células tumorais, porém, dadas translocações no FL verifica-se a expressão aberrante deste gene. (45)

Algo que, frequentemente, dificulta o diagnóstico do FL é o facto de existir um número significativo desses linfomas com arquitetura folicular e sem expressão de CD-10. Em

particular, quanto maior o grau do FL, maior é a taxa de negatividade de CD-10. Deste modo existem outros marcadores auxiliares, embora sejam menos comuns, como LMO2, GCET1 e HGAL. (45)

Em células neoplásicas associadas a um **linfoma MALT**, o fenótipo verificado é CD5-, CD10-, CD20+, CD19+, CD22+, CD23-, CD43+/-, CD79a+, BCL-2+, BCL-6 -, ciclina D1 -. Este fenótipo é virtualmente idêntico às células B da zona marginal não neoplásicas, portanto, uma avaliação de clonalidade é recomendada. (71,72)

Para definir a linhagem de células T, associadas a **linfomas PTCL**, podemos utilizar marcadores como CD2, CD3, CD5 e/ou CD7. Posteriormente, o painel de marcadores deve incluir CD30, CD4 e CD8. (73)

De um modo geral, as principais características do **AITL** são: CD3(-/dim), CD4(+), CD10(dim/+), PD-1(+); as principais características do **ALCL** são: CD3(-/dim), CD4(+), CD5 (-), CD30(+), HLA-DR(+). Em **PTCL-NOS** verifica-se a perda de um ou mais antígenos associados às células T, mais frequentemente CD5 e CD7, sendo que CD4 e CD8 podem ser defeituosos ou co-expressos em cerca de 40% dos casos. (29,67)

As características fenotípicas dos LNH estão resumidas na Tabela 9:

Tabela 9 - Fenótipo dos linfomas não-Hodgkin

Tipo de Linfoma	Fenótipo
DLBCL subtipo GC	CD10+; BCL-6+; MUM1-
DLBCL subtipo não-GC	CD10-; BCL-6-; MUM1+
Linfoma Folicular	CD10+; BCL-2+
Linfoma MALT	CD5-; CD10-; CD20+; CD19+; CD22+; CD23-; CD43+/-; CD79a+; BCL-2+; BCL-6 -; ciclina D1 -
PTCL-NOS	Perda de expressão de CD3, CD5 e/ou CD7; CD4 e CD8 podem ser defeituosos ou co-expressos.
PTCL-AITL	CD3(-/dim); CD4(+); CD10(dim/+); PD-1(+)
PTCL-ALCL	CD3(-/dim); CD4(+); CD5 (-); CD30(+); HLA-DR(+)

DLBCL: Linfoma difuso de grandes células B; GC: Centro germinativo; CD: Cluster de diferenciação; BCL: Proto-oncogene inibidor da apoptose; MUM: Oncogene do mieloma múltiplo; MALT: Tecido linfoide associado à mucosa; PTCL: Linfoma periférico de células T; NOS: Sem outra especificação; AITL: Linfoma angioimunoblástico de células T; ALCL: Linfoma anaplásico grande; HLA-DR: Isótipo DR do Antígeno Leucocitário Humano.

5.3. Biomarcadores de Prognóstico de Linfomas

Tendo em conta a diversidade deste grupo de neoplasias, dadas as diferentes apresentações clínicas e prognósticos variados, a identificação e utilização de biomarcadores de prognóstico no linfoma tem um impacto significativo na gestão e resultados do doente.

Estes biomarcadores são indicadores moleculares ou celulares que podem ajudar a prever a progressão da doença, a resposta terapêutica e o prognóstico do doente. Assim, a utilização destes não só aumenta a precisão dos regimes de tratamento, como também contribui para uma melhor estratificação do risco e monitorização dos doentes. O futuro deste campo passa pelo refinamento de painéis de biomarcadores para melhorar a precisão e explorar novos alvos terapêuticos. (74)

5.3.1. Biomarcadores de Prognóstico no Linfoma de Hodgkin

No **cHL** existem vários tipos de biomarcadores de prognóstico que podem ser relevantes, entre os quais alguns linfócitos T, predominantes nesta neoplasia.

Diversos estudos demonstram que linfócitos T CD4+ estão mais presentes neste tipo de linfoma que os linfócitos T CD8+. As populações mais abundantes de células T englobam o grupo Treg CD4+/CD5+, sendo que este revela o aumento do gene de ativação de linfócitos de pontos de verificação imune 3 (LAG3) e da proteína 4 de linfócitos T citotóxicos (CTLA4). (75)

Para além disso, estas células foram encontradas em estreita proximidade espacial com células HRS que tinham expressão reduzida de MHC-II. A perda da expressão de MHC-II é conhecida por ser um preditor negativo da resposta ICI, aumentando o potencial destas células como potenciais mediadores de resistência. (75)

Por outro lado, estudos demonstraram que IL-6, a única citocina com maior expressão génica em células HRS MHC-II-negativas, poderia induzir células Treg CD4+/LAG3+. IL-6 é uma citocina pluripotente produzida por macrófagos e linfócitos com habilidades de sinalização pró-tumorigénica em diferentes malignidades, pelo que a sua presença está associada a um pior prognóstico. (75,76)

Adicionalmente, LAG3 é um inibidor crítico de ponto de verificação do microambiente tumoral (TME) no cHL, uma vez que, reduz a expressão de MHC-II em células HRS.

Para além disso, atua sinergicamente com PD-1 e/ou CTLA-4 para limitar a expansão das células T. (77) Deste modo, uma alta proporção de linfócitos Treg LAG3+ correlacionou-se com uma tendência para sobrevivência específica da doença (DSS) inferior. (75)

Estudos recentes identificam um subconjunto de células de HRS, definidas fenotipicamente como CD30+CXCR5+, rodeadas de macrófagos CXCL13+, principalmente no subtipo LRHL. Uma das funções da CXCL13 é ser um atrativo para linfócitos B *naive*, e também ser um ligando da CXCR5, sendo que, co-expressa, frequentemente, PD-1, co-estimulador de células T induzível (ICOS) e MHC-II. Assim, em cHL, CXCL13+PD-1+, está associado a um mau resultado clínico. (75,78)

Por sua vez, os macrófagos associados a tumores (TAMs) contribuem para a supressão da resposta imune resultando na progressão da neoplasia, sendo que um dos marcadores destas células é o CD68. Assim, a alta expressão génica de CD68 correlaciona-se com uma sobrevivência global (OS) inferior, à semelhança de uma alta proporção de leucócitos PDL-1+ (Figura 10). (75)

Deste modo, a expressão aberrante de componentes da via PD-1 foi definida como um marcador de prognóstico. Os genes PDL-1 estão localizados ao nível do cromossoma 9p24, pelo que, a sua amplificação pode constituir algum valor prognóstico. (75)

Foi ainda demonstrada evidência de que o aumento da expressão de outras moléculas de ponto de verificação imune além de PDL-1, comoIDO-1, LAG-3 e imunoglobulina de células T e proteína 3 contendo domínio de mucina (TIM3), estão associadas a resultados clínicos adversos. (75)

É importante ainda referir que, a PET também pode ser utilizado como parâmetro de prognóstico, tanto no LH, como para todos os restantes LNH. Medidas como Dmax, obtida através da análise PET, indica que quanto maior o seu valor mais disseminado estará o tumor, correlacionando-se com uma PFS menor. Da mesma forma, o aumento do volume metabólico do tumor (TMV) e da glicólise da lesão tumoral (TLG), reflete uma carga tumoral maior e mais ativa, logo um pior prognóstico. (79)

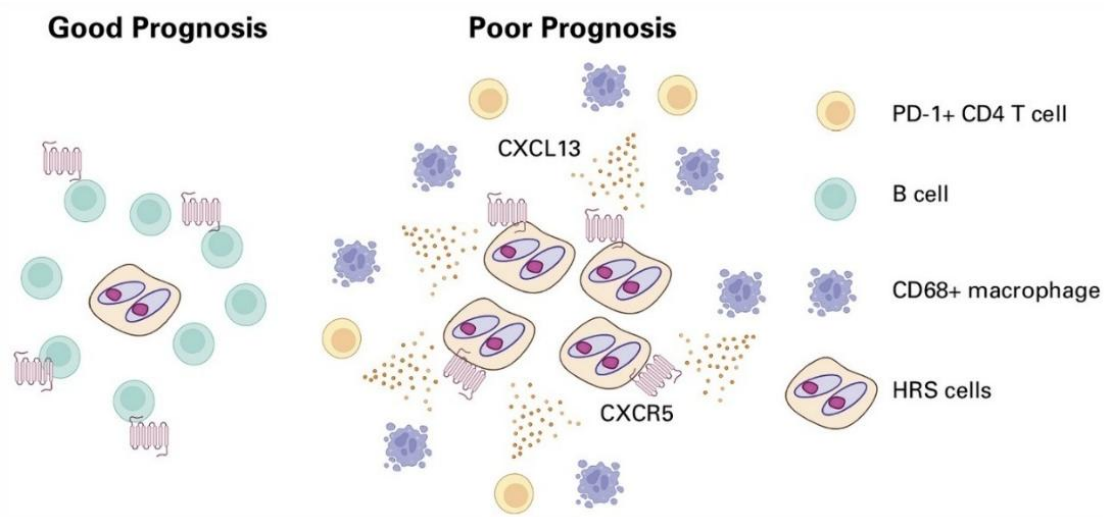


Figura 10 - Resumo gráfico dos achados no microambiente de cHL, revelando bom e mau prognóstico, adaptado (78). É revelado que o bom prognóstico quando existem linfócitos B CXCR5+ no microambiente do cHL, enquanto, o mau prognóstico é associado à presença de linfócitos T CD4+ marcados com PD-1, bem como, a macrófagos CD68+ na periferia de células HRS.

5.3.2. Biomarcadores de Prognóstico no Linfoma não-Hodgkin

No **linfoma difuso de grandes células B (DLBCL)**, foi definido, recentemente, um valor de prognostico com base na sobrevida global (OS), de cada subtipo (Tabela 10).

Tabela 10 – OS com base no subtipo de DLBCL adaptado de (68,80,81)

Subtipo de DLBCL	Sobrevida global em 5 anos	Prognóstico
MCD	40%	Mau
N1	27%	Mau
A53	63%	Intermédio
BN2	67%	Intermédio
ST2	84%	Bom
EZB-MYC+	48%	Mau
EZB- MYC-	82%	Bom

As análises de FISH mostraram que os linfomas de células B, considerados como DLBCL-NOS com base na morfologia e no fenótipo, podem apresentar rearranjos duplos ou triplos de MYC, BCL-2 e/ou BCL-6. (82)

Relativamente aos biomarcadores, BCL-2 é sobreexpresso em 47-58% dos pacientes com DLBCL. (81) Atualmente, este biomarcador tem significado preditivo associado a uma sobrevida inferior, especialmente quando é co-expresso com MYC. (74,80,81)

Alguns pacientes com DLBCL apresentam sobreexpressão de MYC, um proto-oncogene, sem alterações genéticas: dados existentes sugerem que apenas um terço dos pacientes com sobreexpressão de MYC realmente carregam uma translocação, enquanto outros autores sustentam que estes podem ser falsos positivos e devem ser reavaliados pela triagem FISH. (40)

Em contrapartida, a elevada expressão de BCL-6 revela ser um fator de prognóstico positivo em doentes com DLBCL. No entanto, mutações em TP53 estão correlacionadas com um prognóstico negativo; o mesmo se verifica na expressão de outros genes, como STAT3, FOXP1, MYD88. (74,80–82)

Vários miRNAs podem ser usados como biomarcadores prognósticos de linfomas, sendo que o miR-155, o mais prevalente no DLBCL, auxilia a diferenciação de subtipos e prediz um mau prognóstico, visto que, influencia a proliferação, apoptose e angiogénese, levando a uma resistência à terapêutica. (74,80)

Definir o TME também é de extrema relevância para o prognóstico da doença. (82) Diversos estudos foram feitos de modo a caracterizar a implicação de cada elemento da sua constituição, por exemplo, maiores proporções de miofibroblastos, células dendríticas e linfócitos T CD4⁺ correlacionaram-se com OS superiores, enquanto linfócitos NK, células plasmáticas (PCs) ativadas, bem como, linfócitos Treg FOXP3, correlacionaram-se com desfecho inferior. (81)

Recentemente, o papel do eixo PD-1/PDL-1 foi destacado, demonstrando-se que a sobreexpressão de PDL-1 por células tumorais associa-se a prognósticos fracos; porém, a expressão de PD-1 dentro do TME pode prever um resultado mais favorável. Aliado a isto, o papel de subconjuntos celulares também foi avaliado, observando-se que uma elevada razão CD4⁺CD8⁺:M2⁺PDL-1 apresenta resultados mais favoráveis. (81)

Atualmente, estudos relativos a potenciais biomarcadores de prognóstico metabólicos como a presença de corpos cetónicos estão a ser realizados. (83) Por outro lado, estudos de que a expressão genética de EBF1/MYO/CARL é relevante para o estabelecimento do prognóstico de DLBCL face à resposta a R-CHOP têm vindo a surgir. Estes revelaram que a expressão baixa de EBF1, baixa de MYO, elevada de CARL está

associada a um pior prognóstico, enquanto a expressão elevada de EBF1, elevada de MYO, baixa de CARL se correlaciona a um melhor prognóstico e OS do doente. Porém, são necessários estudos adicionais que confirmem o papel efetivo destes biomarcadores do DLBCL. (84)

Todos estes biomarcadores de prognóstico estão resumidos na Tabela 11:

Tabela 11 - Biomarcadores de prognóstico de DLBCL adaptado de (74,80–82)

Biomarcador	Prognóstico
BCL-2	Não Favorável
MYC	Não Favorável
BCL-6	Favorável
TP53	Não Favorável
miR-155	Não Favorável
Miofibroblastos, células dendríticas e linfócitos T CD4+	Favorável
Linfócitos NK, PCs ativadas, linfócitos Treg FOXP3+	Não Favorável
Superexpressão de PDL-1 por células tumorais	Não Favorável
Expressão de PD-1 por células T dentro do TME	Favorável
Razão CD4*CD8:M2*PD-L1	Favorável

BCL: Proto-oncogene inibidor da apoptose; MYC: *Myelocytomatosis oncogene*; TP53: Proteína supressora de tumor p53; miR: MicroRNA; CD: Cluster de diferenciação; PDL: Ligante de proteína/s de morte celular programada; PD: Proteína/s de morte celular programada; M2: Macrófagos 2.

O prognóstico de **linfoma folicular** (FL) foca-se em diferentes modelos, sendo um dos mais recentes o m7-FLIPI em adição ao PET. Este modelo integra sete mutações essenciais no FL (EZH2, ARID1A, MEF2B, EP300, FOXO1, CREBBP e CARD11), uma vez que, surgiram como os biomarcadores mais significativos de FFS. (79) As mutações nos genes EP300 e FOXO1 têm coeficientes positivos mais fortes (correlacionados com um prognóstico adverso); contrariamente, ARIDIA e EZH2 demonstraram coeficientes negativos mais fortes, ou seja, prognóstico favorável. (85)

TP53 é outro gene bem descrito, sendo que mutações no mesmo geram perda de funções supressoras de tumor, contribuindo para o desenvolvimento e progressão do cancro. (86) STAT6 é, igualmente, um gene definido com um mau prognóstico. (61)

Ki-67, um marcador de proliferação celular, aliado ao TME, é também um elemento-chave no que diz respeito ao prognóstico do FL, visto que, permite identificar doentes com FL com maior risco de progressão precoce da doença. (79)

Mais uma vez, o papel do TME é fundamental para que a neoplasia se possa desenvolver, sendo essencial conhecer o mesmo, embora, devido à sua heterogeneidade, esta seja uma tarefa contraditória. (86)

Em termos celulares, foram descritos resultados inferiores correlacionados com uma maior proporção CD4/CD8, embora este facto não esteja bem estabelecido. Nos linfócitos T CD4+, em relação ao seu impacto na transformação tumoral, a expressão intrafolicular está associada a prognósticos inferiores, enquanto a expressão interfolicular foi associada a valores mais favoráveis. (86) Outro motivo para que maiores razões CD4/CD8 se relacionem com prognósticos fracos deve-se às populações de linfócitos Treg CD4/CD8+ FOXP3+, onde, a presença de linfócitos CD4+ FOXP3+ geram prognósticos não favoráveis e a presença de linfócitos CD8+ FOXP3+ geram prognósticos favoráveis. (86) Para além destas células, existem outras com bastante impacto, tal como as células dendríticas foliculares, no entanto, o seu papel no prognóstico deste linfoma ainda não está definido, uma vez que, diferentes estudos relatam resultados distintos.

A subpopulação estromal mais proeminente no FL são as células reticulares foliculares, que secretam IL-4, CXCL12, CXCL13, IL-7 e BAFF. Enquanto o próprio BAFF foi relatado sem impacto no resultado, a sua contraparte expressa em linfócitos B, o recetor BAFF (BAFFR), foi definido com um impacto inferior no resultado. (86)

Quanto aos macrófagos, resultados referentes aos CD68+, bem como, a macrófagos protumorais, cujo fenótipo expressa CD163, CD206 e CSF-1R, demonstraram também ser contraditórios, pelo que, são necessários estudos mais concretos, no entanto há indícios de que se relacionem com um prognóstico adverso. (86)

O papel da angiogénese também é particularmente relevante, visto ser importante no fornecimento de nutrição e oxigénio. Biomarcadores angiogénicos como VEGF foram estudados e demonstraram um prognóstico inferior. (86)

Na Tabela 12 é apresentado um resumo dos biomarcadores abordados, bem como, o seu valor de prognóstico.

Tabela 12 - Biomarcadores de prognóstico de FL adaptado de (74,79,85,86)

Biomarcador	Prognóstico
EP300 e FOXO1	Não Favorável
ARIDIA e EZH2	Favorável
TP53	Não Favorável
STAT6	Não Favorável
Ki-67	Não Favorável
Linfócitos T CD4+ FOXP3+	Não Favorável
Linfócitos T CD8+ FOXP3+	Favorável
BAFFR	Não Favorável
Macrófagos CD68+ e CD163+	Não Favorável
VEGF	Não Favorável

EP300: Proteína p300 de ligação à região inicial do adenovírus; FOXO1: *Forkhead Box O1*; ARIDIA: Proteína 1A contendo domínio interativo rico em AT; EZH2: Potenciador do *Zeste Homolog 2*; TP53: Proteína supressora de tumor p53; STAT: Transdutor de sinal e ativador da transcrição; Ki-67: Proteína nuclear associada à proliferação celular; CD: Cluster de diferenciação; FOXP3: Proteína P3 *forkhed box*; BAFFR: Recetor BAFF (Fator de ativação das células B); VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

O **linfoma MALT** está intimamente ligado à ocorrência e desenvolvimento de infecções crônicas e inflamação, muitas vezes, dada a hipótese da presença de um agente infeccioso. Deste modo, células associadas à inflamação e relacionadas com respostas imunes, contribuindo para a tumorigênese, como monócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas podem ter valor de prognóstico. (87)

Assim, foi estabelecido que uma baixa razão linfócitos/monócitos (LMR) está relacionada com um prognóstico inferior no linfoma MALT. Os monócitos desempenham uma função marcadamente ativa na ocorrência e metástase de tumores, visto que, inibem a resposta imune adaptativa em tecidos tumorais e induzem a fuga imune de células tumorais. Por outro lado, levam à expressão do PDL-1, que pode enfraquecer a proliferação de células efectoras, impedir a diferenciação e maturação de linfócitos, induzindo assim a recorrência e proliferação tumoral. (87)

Adicionalmente, os monócitos podem ser diferenciados em macrófagos associados a tumores (TAMs) e participar da composição do TME. Estes TAMs podem-se dividir

em dois grupos: M1 (pró-inflamatórios, ativados por lipopolissacarídeo ou interferão gama) ou M2 (anti-inflamatórios, ativados por interleucina IL-4, IL-13 ou IL-10). Estudos revelam que, níveis crescentes de macrófagos M1 indicam melhor prognóstico, enquanto níveis crescentes de macrófagos M2 preveem piores resultados. (87)

O bloqueio do fator TGF- β pode levar à depleção de neutrófilos, o que reduz o efeito antitumoral do tratamento, sugerindo um pior prognóstico. Por outro lado, consensos crescentes têm sugerindo que as plaquetas são recrutadas para envolver células tumorais, protegendo-as das respostas imunológicas e promovendo o crescimento e disseminação do tumor. Deste modo, para além da LMR, a razão plaquetas-linfócitos (PLR); neutrófilos-linfócitos (NLR) e o índice de imunoinflamação sistêmica (SII) também poderão dar dados importantes no que diz respeito ao prognóstico do linfoma MALT, apesar de ainda não ter sido relatado o seu papel neste linfoma. (88)

Assim, existem dados limitados sobre biomarcadores de prognóstico em EMZL MALT, sendo tipicamente CD5-, onde a expressão de CD5 associa-se ao envolvimento não gástrico, bem como, à disseminação da doença. Da mesma forma, a presença da mutação t(11;18) foi associada a um maior tempo para recidiva da doença, menor duração da remissão e resistência a agentes alquilantes orais. A expressão de FOXP1 foi associada a uma maior taxa de recidiva e menor sobrevida livre de doença, enquanto BCL-10 foi associada a EMZL avançado. (89)

Outros fatores clínicos relatados associados a um pior resultado são idade >60 anos, lactato desidrogenase (LDH) elevado, β 2 microglobulina (β 2-MG), anemia (hemoglobina <12 g/dL), trombocitopenia, linfopenia, albumina sérica baixa, entre outros. (89)

Na Tabela 13 estão resumidos todos os biomarcadores acima abordados, bem como, o seu valor de prognóstico.

Tabela 13 - Biomarcadores de prognóstico de linfomas MALT adaptado de (87–89)

Biomarcador	Prognóstico
Baixa LMR	Não Favorável
Expressão de PDL-1	Não Favorável
Macrófagos M1	Favorável
Macrófagos M2	Não Favorável
Bloqueio TGF- β	Não Favorável
Expressão de CD5	Não Favorável
Expressão de FOXP1 e BCL-10	Não Favorável
β 2-MG e LDH elevados	Não Favorável

LMR: Razão linfócitos/monócitos; PDL: Ligante de proteína/s de morte celular programada; TGF- β : Fator de crescimento transformador beta; CD: Cluster de diferenciação; FOXP1: Proteína P1 *forkhed box*; BCL: Proto-oncogene inibidor da apoptose; β 2-MG: β 2-MG - β 2-microglobulina; LDH: Lactato desidrogenase.

Relativamente aos **linfomas periféricos de células T (PTCL)**, à semelhança de outros linfomas, um dos biomarcadores de prognóstico envolve valores elevados de Ki-67 como sendo preditivos de maus resultados. Adicionalmente, um alto nível sérico de LDH e a presença de infecção por EBV foram também definidos como relevantes num pior prognóstico (Tabela 14). Imagens PET auxiliam também a definir o prognóstico atual. (90)

No que diz respeito ao PTCL-NOS, o subtipo de linfoma por si só pode dar indícios de um prognóstico melhor/pior, visto que, pacientes com expressão de GATA3 têm um pior prognóstico face a doentes com assinatura de TBX21, dada a resposta significativamente melhor à quimioterapia. (67,91) É importante ainda referir que a expressão de CD3 e CD8 no subtipo PTCL-NOS sugere um pior prognóstico. (29)

Relativamente ao subtipo ALCL, a positividade/negatividade de ALK tem associações prognósticas distintas. O ALCL ALK+ está associado a doentes mais jovens, pelo que foi reconhecido um prognóstico e resposta à quimioterapia melhorados. (90,91) Antagonicamente, ALCL ALK- tendem a ocorrer numa faixa etária mais avançada e a ter prognósticos menos positivos. Nestes casos, são verificados rearranjos em DUSP22 e TP63, onde o resultado de ambos no prognóstico é distinto. Rearranjos TP63 são dados como menos favorável, com uma OS diminuída, em contrapartida,

inicialmente, DUSP22 foi identificado como um biomarcador excelente, preditor de resultados clínicos semelhantes aos verificados em ALK+, porém, estudos mais recentes já contrariam esta hipótese, pelo que, são necessários mais estudos. (90,91)

Os casos de ALCL triplo-negativo demonstraram uma sobrevida global intermédia entre aqueles que têm rearranjo em DUSP22 ou TP63. De qualquer forma, apesar das incertezas relativamente ao papel prognóstico de DUSP22, sabe-se que a sobrevida é superior comparando com casos com rearranjo em TP63 ou triplo-negativo. (90,91)

Quanto à expressão de PD-1/PDL-1 no ambiente tumoral de AITL, também está associado a uma redução da OS, visto que facilita a evasão tumoral. (90,92) Para além disso, a expressão de CD7 tem um impacto positivo no prognóstico deste linfoma, enquanto doentes que expressam CD38 e Ki-67 tiveram um prognóstico pior. (29)

De uma maneira geral, também no PTCL a NLR é relevante no microambiente tumoral, pelo que, quanto mais elevada for a mesma pior será o prognóstico. (93)

Tabela 14 - Biomarcadores de prognóstico de linfomas PTCL adaptado de (90)

Subtipo	Biomarcador	Prognóstico
	Ki-67; LDH; EBV; NLR	Não Favorável
PTCL-NOS	GATA3	Não Favorável
	TBX21	Favorável
	CD3 e CD8	Não Favorável
ALCL ALK+		Favorável
ALCL ALK-	DUSP22	Favorável
	TP63	Não Favorável
AITL	PD1/PDL-1	Não Favorável
	CD7	Favorável
	CD38	Não Favorável

Ki-67: Proteína nuclear associada à proliferação celular; LDH: Lactato desidrogenase; EBV: Vírus Epstein-Barr; NLR: Razão neutrófilo/linfócito; PTCL: Linfoma periférico de células T; NOS: Sem outra especificação; GATA3: Fator de transcrição de importante na proliferação, desenvolvimento e diferenciação celular; TBX21: Fator de Transcrição T-Box 21; CD: Cluster de diferenciação; ALCL: foma anaplásico grande; ALK: *Anaplastic Lymphoma Kinase*; DUSP22: Proteína fosfatase 2 de dupla especificidade; TP63: Proteína supressora de tumor p63; AITL: Linfoma angioimunoblástico de células T; PD: Proteína/s de morte celular programada; PDL: Ligante de proteína/s de morte celular programada.

Para além destes biomarcadores específicos de cada subtipo de linfoma, recentemente, abordagens que envolvem o doseamento de DNA livre de células (cfDNA) e DNA tumoral circulante (ctDNA) têm sido promissoras no que diz respeito à definição do prognóstico da doença e eficácia terapêutica.

O cfDNA refere-se ao DNA libertado na corrente sanguínea, resultante de processos como apoptose, necrose e secreção, tanto de células saudáveis como cancerígenas. Em doentes saudáveis a sua concentração é baixa, podendo-se elevar em condições traumáticas, para além das neoplasias, como EAM. (94,95) No contexto de um cancro, a rápida expansão clonal e a pressão seletiva impulsionam a progressão da doença e aumentam o ctDNA, um subconjunto do cfDNA, onde células malignas se desprendem do tumor primário/de metástases para a corrente sanguínea. Assim, ambos os tipos de células, abrangem informações genéticas e epigenéticas que espelham o genoma/epigenoma da célula cancerígena original. A deteção de cfDNA/ctDNA ganhou relevância significativa no diagnóstico do cancro, dada a especificidade incomparável com outros biomarcadores utilizados. (94) Como exemplo do significado prognóstico de cfDNA, ao observar a análise destes parâmetros em doentes com DLBCL (a) e linfoma de linfócitos T (b) em pré-tratamento (Figura 11), foi possível observar que quando o cfDNA é reduzido a sobrevida livre de eventos (EFS) e a OS são superiores quando comparados com doentes em que os níveis de cfDNA são elevados. (96)

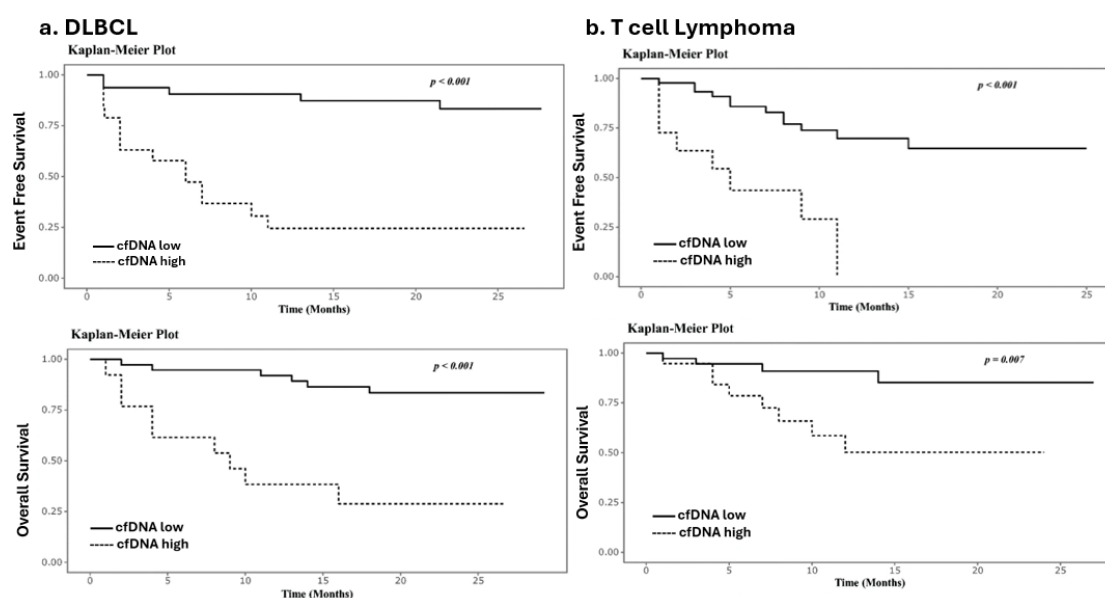


Figura 11 - EFS e OS em doentes com DLBCL (a) e linfomas de linfócitos T (b), em pré-tratamento com diferentes níveis de cfDNA adaptado de (96). Os gráficos mostram a EFS, em cima, e a OS, em baixo, em doentes com níveis baixos (linha contínua) e elevados (linha tracejada) de cfDNA. Em ambos os subtipos de linfoma, níveis elevados de cfDNA associaram-se a pior prognóstico, enquanto níveis diminuídos têm melhores chances de sobrevivência.

5.4. Biomarcadores de Eficácia Terapêutica

Atualmente, existe uma necessidade urgente de investir na investigação/estudo dos biomarcadores de eficácia terapêutica nos linfomas, de modo a desenvolver marcadores específicos e sensíveis para prever a resposta de uma determinada terapêutica e avaliar quais os doentes que poderão beneficiar de quimioterapia sistêmica, ajudando a desenvolver regimes terapêuticos mais precisos. (80)

O uso de biomarcadores quantitativos extraídos de exames PET para caracterizar a resposta clínica em doentes com linfomas tem ganho especial relevância. Tal como já referido, a imagiologia por PET é rotineiramente usada tanto no estadiamento inicial como na estimativa dos resultados de sobrevivência (prognóstico), e agora também para a avaliação da resposta ao tratamento. (97)

5.4.1. Biomarcadores de Eficácia Terapêutica no Linfoma de Hodgkin

No linfoma de Hodgkin, PET é extensivamente utilizado para determinar a eficácia terapêutica, verificando-se que a negatividade para PET demonstra, à partida, uma doença residual mínima indetetável. (98) No entanto, de modo a obter uma resposta mais fundamentada, recomenda-se a suplementação dos resultados de PET com biomarcadores adicionais como ctDNA/ cfDNA ou outros biomarcadores como é o caso do TARC, no cHL. (99)

Tal como referido anteriormente, TARC é reconhecido como um importante biomarcador de diagnóstico no cHL, uma vez que cerca de 90% das biopsias mostram células HRS positivas para TARC, onde a maioria dos doentes apresentam níveis deste biomarcador significativamente elevados no pré-tratamento. (52)

Deste modo, estudos revelaram que doentes no estadio I da doença expressam valores inferiores de TARC quando comparados com doentes num estadio mais avançado, sendo, por isso, um indicador de doença ativa. Posteriormente, foi revelado que o TARC pode também servir como marcador de avaliação de resposta devido à sua diminuição após 2 ciclos de quimioterapia. (100) Além disso, demonstrou-se que níveis séricos aumentados de TARC mantidos após o tratamento correlacionam-se com pior sobrevida, maior risco de progressão/recidiva da doença. Nestes casos, os doentes poderão beneficiar de uma escalada precoce do tratamento. (100)

CfDNA é uma abordagem promissora no que diz respeito à eficácia terapêutica, visto que, tem aplicação ao nível da detecção precoce dos tumores, avaliação da sua genética, monitorização da resposta terapêutica, detecção da doença residual mínima, evolução molecular e surgimento de resistências pós-tratamento. (101) Assim, o sequenciamento de cfDNA pode ser usado para revelar a estrutura clonal espacial e temporal do tumor; para definir mutações de clones provavelmente presentes nas células do LH, verificando após a terapêutica a presença/ausência dos mesmos. (98,102)

5.4.2. Biomarcadores de Eficácia Terapêutica no Linfoma não-Hodgkin

No LNH os biomarcadores que revelam a resposta à terapêutica, são praticamente os mesmos que se aplicam no LH, uma vez que, são considerados marcadores versáteis e universais, como é o caso do PET e do cfDNA.

PET, para além de nos dar dados visuais, também permite explorar marcadores metabólicos como o valor máximo de captação padrão (SUV_{max}), TMV e TLG. As diminuições destes marcadores podem nos dar informação relativa à eficácia da terapêutica instituída. Exemplos disso, estão relatados em estudos que demonstraram uma diminuição da SUV_{max} ao 28º dia de tratamento com CART-T em linfomas de grandes linfócitos B. (103)

Em comparação às células normais, as células cancerígenas necessitam de mais glicose, passando por processos de glicólise aeróbica para produzir ATP, deste modo, o aumento do metabolismo lipídico e a alta captação de glicose são demonstrados por malignidades originadas por linfócitos B, os tipos de LNH mais frequentes. Assim, a redução da necessidade de captação de glicose pode ser vista como um biomarcador de eficácia terapêutica. (104)

Mais tarde verificou-se a presença de níveis aumentados de LDH em doentes com estas neoplasias. Assim, para além de servir como biomarcador de prognóstico, pode ser empregue como uma ferramenta de triagem para saber a resposta de um determinado tratamento ou a sua recorrência. Analisou-se ainda a importância da β 2-MG, onde se provou que níveis elevados de β 2-MG e LDH revelam um pior prognóstico e resposta à terapêutica a curto prazo. (104)

Por sua vez, em LNH, o ctDNA demonstrou correlacionar-se tanto com o TMV como com o LDH, podendo prever a eficácia/resposta à terapêutica instituída, onde, à semelhança do que acontece no LH, níveis aumentados de ctDNA revelam um mau resultado na resposta à terapêutica. (105,106)

Mais recentemente, avaliou-se o papel de RNAs não codificantes circulantes (ncRNA), nomeadamente microRNAs (miRNAs) e os RNAs não codificantes longos (lncRNAs), na monitorização e eficácia terapêutica. (107) Apesar de serem necessários estudos adicionais alguns autores foram capazes de demonstrar que a alta expressão de lncRNAs TUC38, PEG10, HULC, HOTTIP e HOTAIR, bem como, uma expressão diminuída de lncRNA GAS5, foram associados a uma pior resposta à terapêutica R-CHOP em doentes com DLBCL. Por outro lado, a sobreexpressão de lncRNA ROR1-AS1 promove o crescimento do tumor e diminui a sensibilidade ao ibrutinib e à dexametasona em pacientes com linfoma das células do manto (MCL), reduzindo a eficácia terapêutica. (108)

6. Desafios e Limitações no Uso de Biomarcadores para Linfomas

Nos linfomas, a utilização de biomarcadores é de extrema relevância, uma vez que, estes são responsáveis por nos fornecer respostas quanto ao diagnóstico e estadiamento da neoplasia, prognóstico/sobrevida do doente, bem como, relativamente à resposta e eficácia da terapêutica instituída. No entanto, existem algumas lacunas que permanecem em aberto.

No que diz respeito ao diagnóstico do cLH, entre os quatro subtipos existentes, é possível verificar um padrão imunofenotípico comum e característico de expressão de certos antígenos em células neoplásicas, ou seja, positividade para CD15, CD30, PAX-5 (expressão fraca) e, tipicamente, negatividade para outros marcadores de células B, marcadores de células T e CD45. A distinção entre os diferentes subtipos passa pelas diferenças epidemiológicas, progressão da doença, características morfológicas e status do EBV, o que dada à sua subjetividade pode, por vezes levar a resultados falsos negativos pela escassez de células neoplásicas e biomarcadores de diagnóstico. (109)

Algumas incoerências ao nível dos biomarcadores de prognóstico, tanto em LH e LNH, também foram relatadas ao longo desta revisão da literatura, bem como, se verificou uma grande falta de investimento no que diz respeito aos biomarcadores de eficácia terapêutica, o que compromete, em parte tanto o direcionamento da terapêutica como os dados existentes de resposta aos mesmos.

Quanto aos instrumentos utilizados na descoberta e identificação de biomarcadores também permanecem com lacunas por remediar. Exemplo disso são as limitações que advêm do PET, exame de imagem mais utilizado como biomarcador de linfomas. Tal como verificado, PET dá-nos diversos tipos de informação, entre os quais a resposta clínica à terapêutica instituída, no entanto, muitas das vezes a interpretação visual deste exame no fim da terapêutica não coincide com os resultados clínicos, existindo muitas vezes doença residual em doentes com resposta completa negativa para PET, ou seja, falsos negativos. (110)

Esta limitação gera um desafio de extrema importância no que diz respeito ao desenvolvimento de biomarcadores com alta sensibilidade para a deteção da doença residual mínima, o que iria distinguir mais precisamente que doentes atingiram uma

remissão molecular completa. (110) Para além disso, PET permite a exposição de doentes a radiação o que, além de poder gerar efeitos adversos adicionais, pode ser enviesado pelo aumento da captação de FDG em órgãos infiltrados após imunoquimioterapia, infeções e inflamação. Assim, o linfoma pode não apresentar consistentemente alta captação, o que complica a avaliação da resposta à terapia, gerando dificuldades na interpretação de imagens e na tomada de decisões clínicas. (111,112) Outra limitação relevante em PET, é o facto de o exame de imagem ser analisado visualmente pelo olho humano, o que para além de trazer subjetividade ao método, podem não ser verificados alguns padrões importantes. (111)

Fontes também revelam que a tecnologia NGS, apesar de mostrar sensibilidade de deteção, gera problemas com informações incompletas e falsos positivos. (113) Por outro lado, atualmente, com a implementação de biopsias de tecido invasivas foi possível obter informações moleculares de extrema importância para estratificar doentes com linfomas em subgrupos genéticos. Porém, tais procedimentos invasivos também apresentam limitações como é o caso das intervenções cirúrgicas que carregam riscos, não podendo ser realizada em doentes em condições de saúde mais debilitadas. Além disso, a biopsia de tecido não captura totalmente a heterogeneidade espacial e temporal do tumor, visto que apenas um único local do tumor é seriado. (114)

Dados todos estes desafios, perspetivas futuras apontam para a implementação de biopsias líquidas e do doseamento de cfDNA/ctDNA, no entanto, este método também apresenta muitas limitações nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, sendo necessários estudos intensivos para que se torne uma ferramenta de rotina. (112) Na fase pré-analítica, protocolos padronizados para seleção, manuseio, processamento e armazenamento de amostras são cruciais para minimizar erros. A variabilidade biológica em biofluidos apresenta desafios adicionais, e escolher o biofluido apropriado para a descoberta de biomarcadores requer considerar fatores como localização do tumor e acessibilidade. Na fase analítica a quantificação e qualificação do cfDNA são fatores críticos e, deste modo, métodos como ensaios baseados em fluorescência e ferramentas baseadas em PCR são vitais para avaliar a adequação da amostra. Além disso, materiais de referência e a medida do resultado analítico, particularmente em termos de potencial quantitativo e apresentação do resultado, destacam ainda mais os desafios na padronização dos procedimentos de biópsia líquida. Na fase pós-analítica, fatores que afetam crucialmente a sensibilidade e a especificidade são críticos. (112)

Outra limitação deste método é referente ao número de células tumorais circulantes, que poderá não ser suficiente para a realização da biopsia líquida e sequenciamento, como é o caso da monitorização no final do tratamento onde a carga tumoral é extremamente baixa. (85,113,114)

Em suma ainda existem muitos desafios a serem superados dada a heterogeneidade dos linfomas, existindo mais de 80 subtipos; ausência de padronização nos métodos de identificação de biomarcadores, bem como, na interpretação de resultados; falta de sensibilidade ou especificidade de determinados biomarcadores; custo de acesso a certos testes moleculares.

Algumas perguntas mantêm-se em aberto, com perspectivas de serem respondidas num futuro próximo dado ao avanço nas consistentes pesquisas que têm sido feitas nesta área:

1. Quais os biomarcadores de eficácia terapêutica que realmente têm um valor preditivo robusto?
2. No contexto da medicina personalizada, como deveremos correlacionar e adaptar o biomarcador com outros dados clínicos?
3. Qual o papel do cfDNA e da biopsia líquida? Sensibilidade e possível substituição de biopsias invasivas?
4. Biomarcadores em linfomas raros? Quais as perspectivas futuras?

7. Perspetivas Futuras e Avanços na Pesquisa de Biomarcadores

Tal como referido, as análises moleculares de tumores exigem biopsias de tecido invasivas, onde a amostra não representa com precisão a heterogeneidade do tumor. Como forma de superar esta limitação surgiu a biopsia líquida que permite dosear o ctDNA, sendo um biomarcador minimamente invasivo e altamente versátil, podendo contribuir futuramente para a tomada de decisão clínica no linfoma, visto que, fornece uma imagem em tempo real da composição genética e facilita a quantificação da carga tumoral a qualquer momento durante o curso da doença. (110,114)

Apesar de existir dificuldade da sua implementação na prática clínica, dado que é um procedimento que continua com uma falta de padronização e harmonização entre laboratórios, várias iniciativas têm sido lançadas para definir padrões para manuseio pré-analítico, design de painel, desempenho de ensaio e bioinformática, o que nos indica que num futuro breve poderá ser um procedimento que começa a fazer parte da rotina clínica. Por fim, têm-se feito avanços técnicos para permitirem a deteção de quantidades cada vez menores de ctDNA, o que fará com que este método seja capaz de prever a avaliação prospetiva do valor clínico, estratificar o erro e monitorizar a doença residual mínima, tanto em linfomas de células B como células T, num futuro próximo. (110,113–116) As aplicações destes procedimentos podem passar, por exemplo, pela monitorização precoce do ctDNA para estratificar doentes com DLBCL com base na sua resposta molecular à terapêutica de primeira linha, R-CHOP. Doentes que demonstrem rápida depuração do ctDNA após um ou dois ciclos de terapêutica podem ser candidatos a um descalonamento da terapêutica, reduzindo a exposição a regimes potencialmente tóxicos sem comprometer a eficácia. Por outro lado, doentes com positividade persistente podem ser direcionados para opções terapêuticas mais intensas ou alternativas para superar a resistência precoce. Essa abordagem adaptativa aproveita a dinâmica do ctDNA para informar decisões de tratamento personalizadas e em tempo real que podem, em última análise, melhorar a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global. (116)

Para combater as lacunas existentes no famoso exame de imagem PET, pretende-se, futuramente, aplicar a contribuição da inteligência artificial e análise radiômica na

compreensão dos dados fornecidos por este procedimento. (111) A radiômica é um campo de pesquisa rápido, focado na extração quantitativa de características de imagens médicas e na transformação delas em dados ricos e de alta dimensão. Melhora ainda o diagnóstico, facilita o desenvolvimento de estratégias de tratamento individualizadas e refina as previsões de resultados com base em fatores como heterogeneidade do tumor e características biológicas, patológicas e metabólicas do linfoma. Por outro lado, o processo de aprendizagem da IA começa com a colheita e o pré-processamento de dados, seguidos pela extração de características, treinamento do modelo e avaliação. Deste modo, teve um impacto profundo no atendimento ao doente, detecção de doenças, diagnóstico e planeamento do tratamento, visto permitir a segmentação de imagens médicas, análise automatizada, identificação de doenças, avaliação de risco e da resposta terapêutica e previsão de prognóstico. A IA otimiza ainda a qualidade da imagem, permitindo a análise quantitativa de biomarcadores de imagem e fornecendo aos médicos ferramentas de suporte à decisão. (111)

Embora esteja à vista as perspectivas futuras do uso destes métodos adicionais, mais estudos serão necessários para que os mesmos integrem a rotina clínica.

Na prática clínica, outros métodos de detecção de biomarcadores têm sido abordados. A metabolômica é um procedimento com perspectivas futuras favoráveis, consistindo na avaliação de parâmetros quantitativos e qualitativos dos metabolitos presentes em células, tecidos e fluidos corporais, que podem revelar informações cruciais sobre o estado do tumor, estando associado ao diagnóstico e compreensão de doenças, descoberta de novos alvos para fármacos, personalização do tratamento e monitorização de resultados terapêuticos. (117) As suas vantagens englobam o facto de pequenas mutações apresentarem alterações metabólicas óbvias; os metabolitos serem menos numerosos que genes e proteínas; ser um estudo mais abrangente; alterações metabólicas podem refletir diretamente o estado patológico do organismo. (118) Alguns estudos já foram desenvolvidos e foi registada uma prevalência significativa de ácido eláidico e hipoxantina A(HX) em doentes que sofrem de linfoma de Hodgkin, MM, LLC e DLBCL em comparação com indivíduos saudáveis. Mais investigações terão de ser desenvolvidas, mas acredita-se que este procedimento será uma mais-valia na pesquisa e avanços de biomarcadores. (117,118)

Por fim, o futuro da terapêutica passará pela medicina personalizada. Aqui, os biomarcadores são, especialmente, valiosos para a detecção precoce, prognóstico e diagnóstico da doença, bem como, para a previsão da resposta ao tratamento. Permitem-nos selecionar os indivíduos adequados para o tratamento com medicina personalizada, ou seja, fornecer o medicamento certo ao doente certo. Porém, para atingir este objetivo continua a ser necessário avanços na descoberta de biomarcadores e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que possam ser otimizadas para a seleção individual de fármacos e doses. (119) Exemplos disso estão presentes nos avanços da terapia CAR-T personalizada que tem demonstrado resultados promissores, no entanto as limitações predem-se, em muito, pela falta de biomarcadores. (120) Nesta ótica, diversos estudos têm sido desenvolvidos e diferentes métodos de detecção de biomarcadores têm sido utilizados para que esta terapêutica seja otimizada e utilizada num futuro sem quaisquer inibições. (121)

8. Conclusão

O avanço na compreensão dos linfomas, um grupo heterogêneo de neoplasias líquidas, tem sido, fortemente, impulsionado pela identificação e aplicação de novos biomarcadores. Estes que, tal como referido ao longo desta revisão da literatura, desempenham um papel fundamental ao nível do diagnóstico, estadiamento, bem como, no prognóstico e resposta à terapêutica.

Muitos biomarcadores já são parte integrante e elementos centrais na prática clínica, orientando decisões terapêuticas e contribuindo para a estratificação do risco dos doentes. Além disso, o futuro direciona esta vertente para a incorporação de novas ferramentas moleculares e genómicas que permitem a deteção precoce de recaídas/recidivas, monitorizam a doença residual mínima e antecipam a resistência a uma determinada terapia.

É importante ainda ressaltar que no contexto terapêutico, com o surgimento de tratamentos dirigidos e imunoterapias, utilizando anticorpos monoclonais e células CAR-T, verifica-se a importância crescente da necessidade dos biomarcadores na medicina de precisão, onde a escolha e o sucesso das mesmas se relacionam com a presença/ausência de marcadores específicos.

No entanto, apesar dos progressos, coexistem limitações a serem superadas, como a padronização de alguns métodos de identificação de biomarcadores, validação de novos biomarcadores em fase de estudo clínico, bem como, a acessibilidade dos diferentes procedimentos nos diversos sistemas de saúde. Assim, a pesquisa contínua nesta área torna-se essencial para consolidar avanços, até então conquistados, bem como, gerar novas oportunidades terapêuticas.

Em suma, os biomarcadores representam não apenas ferramentas técnicas, mas verdadeiros pilares na abordagem moderna, personalizada e eficaz no manejo dos linfomas, sempre com o objetivo final de melhorar desfechos clínicos e a qualidade de vida dos doentes.

Referências Bibliográficas

1. Vail D, Young K. Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemia. In: Hematopoietic Tumors. 2007.
2. Charles A Janeway Jr, PTMW e MJS. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. Science G, editor. New York; 2001.
3. Br J Haematol. Lymphoma Nomenclature - What's in a name? Vol. 197, British Journal of Haematology. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 539–43.
4. Leukemia and Lymphoma Society. UPDATED DATA ON BLOOD CANCERS. 2024 [cited 2025 Jan 17]; Available from: https://www.lls.org/sites/default/files/2024-09/PS80_FactsBook_2024.pdf
5. National Cancer Institute [Internet]. 2024 [cited 2025 Jan 21]. Cancer Stat Facts: Non-Hodgkin Lymphoma. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html>
6. National Cancer Institute [Internet]. 2024 [cited 2025 Jan 21]. Cancer Stat Facts: Hodgkin Lymphoma. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/hodg.html>
7. LYMPHOMA CARE IN EUROPE 2022 REFLECTIONS ON PATIENT EXPERIENCE AND PRIORITIES FOR CARE. 2022.
8. Lima Cajas RR, Panchi Espin GF, Lalama Rueda RA, Lalama Rueda JE, Pavón Patiño FL, Quincha Muñoz MK. Predictive biomarkers in lymphoma: a systematic research review. Ibero-American Journal of Health Science Research. 2024 May 15;4(s):47–56.
9. de Leval L, Jaffe ES. Lymphoma Classification. The Cancer Journal [Internet]. 2020 May;26(3):176–85. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/PPO.0000000000000451>
10. Lynch RC, Gratzinger D, Advani RH. Clinical Impact of the 2016 Update to the WHO Lymphoma Classification. Vol. 18, Current Treatment Options in Oncology. Springer New York LLC; 2017.
11. Holdsworth F, Worku D, Bretton A le, Vella C, Walker E. A guide to Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: similarities and differences. British Journal of Nursing [Internet]. 2021 Sep 23;30(17):S16–22. Available from: <http://www.magonlinelibrary.com/doi/10.12968/bjon.2021.30.17.S16>
12. Ann S LaCasce, Andrea K Ng. Pretreatment evaluation, staging, and treatment stratification of classic Hodgkin lymphoma [Internet]. 2024. Available from: www.uptodate.com
13. Leukemia and Lymphoma Society. Hodgkin Lymphoma [Internet]. 2024. Available from: www.LLS.org/Community
14. Hatem Kaseb; Hani M. Babiker. Hodgkin Lymphoma. StatPearls. 2023;
15. Küppers R. Advances in Hodgkin lymphoma research. Trends in Molecular Medicine. Elsevier Ltd; 2024.

16. Carmen Martínez AB and AS. Classical Hodgkin's Lymphoma. In: The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies. 8th edition. 2024.
17. Burkitt's lymphoma cell, is a cancer of the lymphatic system [Internet]. 2021. Available from: <https://tinyurl.com/>
18. De La Cruz-Merino L, Lejeune M, Nogales Fernández E, Henao Carrasco F, Grueso López A, Illescas Vacas A, et al. Role of immune escape mechanisms in Hodgkin's lymphoma development and progression: A whole new world with therapeutic implications. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012.
19. Payal Aggarwal; Faten Limaiem. Reed Sternberg Cells. *StatPearls*. 2022;
20. Eichenauer DA, Aleman BMP, André M, Federico M, Hutchings M, Illidge T, et al. Hodgkin lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2018 Oct 1;29:iv19–29.
21. Non-Hodgkin Lymphoma. Leukemia and Lymphoma Society [Internet]. 2022; Available from: www.LLS.org/Community
22. Sanjay Vinjamaram, Emmanuel C Besa. Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) Overview Practice Essentials. *Medscape*. 2024;
23. Sumina Sapkota, Hira Shaikh. Non-Hodgkin Lymphoma. *StatPearls*. 2023;
24. Shipra Gandhi, Andre M Kallab. Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL). *MedScape* [Internet]. 2023 Jul [cited 2025 Jan 24]; Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/202969-overview#a2>
25. Hatem Kaseb, Muhammad Ashar Ali, David P. Gasalberti, Nebu V. Koshy. Follicular Lymphoma. *StatPearls*. 2024;
26. Sanjana Mullangi, Manidhar Reddy Lekkala. Mucosa-Associated Lymphoma Tissue. *StatPearls*. 2023;
27. Horwitz SM, Ansell S, Ai WZ, Barnes J, Barta SK, Brammer J, et al. T-Cell Lymphomas, Version 2.2022. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2022 Mar 1;20(3):285–308.
28. V. Ow, MSN, APRN, AOCNP K, Vo, MSN, APRN, FNP A, Cunningham, MPAS, PA-C J. Peripheral T-Cell Lymphoma, Not Otherwise Specified: Diagnosis and Therapeutic Approaches for the Advanced Practice Provider. *J Adv Pract Oncol*. 2024 Feb 1;15(8).
29. Pu Q, Qiao J, Liu Y, Cao X, Tan R, Yan D, et al. Differential diagnosis and identification of prognostic markers for peripheral T-cell lymphoma subtypes based on flow cytometry immunophenotype profiles. *Front Immunol*. 2022 Nov 18;13.
30. Melchardt T, Egle A, Greil R. How I treat diffuse large B-cell lymphoma. Vol. 8, *ESMO Open*. Elsevier B.V.; 2023.
31. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, Salles G, Ladetto M, Tonino SH, et al. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2021 Mar 1;32(3):298–308.

32. Importance of biomarker testing in diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. AstraZeneca [Internet]. 2023; Available from: <https://www.haematologyhorizon.co.uk/content/dam/open-digital/haem-hub/en0/medical-education/downloads/importance-of-biomarker-testing-in-diffuse-large-b-cell-lymphoma-and-mantle-cell-lymphoma.pdf>
33. Zhou Y, Tao L, Qiu J, Xu J, Yang X, Zhang Y, et al. Tumor biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy. Vol. 9, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2024.
34. Narithee Sukswai, Joseph D. Khoury. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14:368–75.
35. Volaric A, Bacchi CE, Gru AA. PD-1 and PD-L1 Immunohistochemistry as a Diagnostic Tool for Classic Hodgkin Lymphoma in Small-volume Biopsies. *American Journal of Surgical Pathology* [Internet]. 2020 Oct;44(10):1353–66. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/PAS.0000000000001524>
36. Hong Fang, Sa A. Wang, L. Jeffrey Medeiros, Wei Wang. Application of flow cytometry immunophenotypic analysis for the diagnosis of mature B-cell lymphomas/leukemias. *Hum Pathol* [Internet]. 2024; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2024.105711>
37. Teodora Statuto. Cytofluorimetric and immunohistochemical comparison for detecting bone marrow infiltration in non-Hodgkin lymphomas: a study of 354 patients. *Leuk Res* [Internet]. 2020;88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.106267>
38. Marc Sorigue, Eloi Cañamero, Milos D. Miljkovic. Systematic review of staging bone marrow involvement in B cell lymphoma by flow cytometry. *Blood Rev*. 2021;47.
39. Schroers-Martin JG, Alig S, Garofalo A, Tessoulin B, Sugio T, Alizadeh AA. Molecular Monitoring of Lymphomas. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2023;18:149–80. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-050520->
40. Ruhe M, Rabe D, Jurischka C, Schröder J, Schierack P, Deckert PM, et al. Molecular biomarkers of DNA damage in diffuse large-cell lymphoma—a review. *J Lab Precis Med*. 2019 Feb;4:5–5.
41. Olszewski AJ, Chorzalska AD, Petersen M, Ollila TA, Zayac A, Kurt H, et al. Detection of clonotypic DNA in the cerebrospinal fluid as a marker of central nervous system invasion in lymphoma. In: *Blood Advances*. American Society of Hematology; 2021. p. 5525–35.
42. Mustafa A. Mafraji. Tomografia por emissão de pósitrons (PET). *Manual MSD*. 2023;
43. Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2022 Nov 1;97(11):1478–88.
44. Alderuccio JP, Kuker RA, Yang F, Moskowitz CH. Quantitative PET-based biomarkers in lymphoma: getting ready for primetime. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2023 Sep 17;20(9):640–57. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41571-023-00799-2>

45. Cho J. Basic immunohistochemistry for lymphoma diagnosis. Vol. 57, Blood Research. Korean Society of Hematology; 2022. p. 55–61.
46. Vega F, Amador C, Chadburn A, Hsi ED, Slack G, Medeiros LJ, et al. Genetic profiling and biomarkers in peripheral T-cell lymphomas: current role in the diagnostic work-up. Vol. 35, Modern Pathology. Springer Nature; 2022. p. 306–18.
47. Martínez-Laperche C, Sanz-Villanueva L, Díaz Crespo FJ, Muñiz P, Martín Rojas R, Carbonell D, et al. EZH2 mutations at diagnosis in follicular lymphoma: a promising biomarker to guide frontline treatment. BMC Cancer. 2022 Dec 1;22(1).
48. Sun R, Medeiros LJ, Young KH. Diagnostic and predictive biomarkers for lymphoma diagnosis and treatment in the era of precision medicine. Modern Pathology. 2016 Oct 1;29(10):1118–42.
49. Weniger MA, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. Vol. 35, Leukemia. Springer Nature; 2021. p. 968–81.
50. Vranić S, Damjanov I. Advances in Diagnostic and Molecular Pathology. Vol. 50, Acta Medica Academica. Academy of Sciences and Arts of Bosnia and Herzegovina; 2021. p. 1–3.
51. Esmeray E, Küçük C. Genetic alterations in B cell lymphoma subtypes as potential biomarkers for noninvasive diagnosis, prognosis, therapy, and disease monitoring. Vol. 44, Turkish Journal of Biology. Scientific and Technical Research Council of Turkey; 2020. p. 1–14.
52. Zijtregtop EAM, van der Strate I, Beishuizen A, Zwaan CM, Scheijde-Vermeulen MA, Brandsma AM, et al. Biology and clinical applicability of plasma thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in classical hodgkin lymphoma. Vol. 13, Cancers. MDPI AG; 2021. p. 1–12.
53. El Hussein S, Fang H, Jelloul FZ, Wang W, Loghavi S, Miranda RN, et al. T-Cell-Rich Hodgkin Lymphoma With Features of Classic Hodgkin Lymphoma and Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma A Borderline Category With Overlapping Morphologic and Immunophenotypic Features. Arch Pathol Lab Med. 2024 Aug 1;148(8):914–20.
54. El Hussein S, O'Malley DP. Classic Hodgkin lymphoma: An illustrative review of select diagnostic limitations and immunomorphological challenges. Hum Pathol. 2024;
55. Moore EM, Swerdlow SH, Gibson SE. J chain and myocyte enhancer factor 2B are useful in differentiating classical Hodgkin lymphoma from nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. Hum Pathol. 2017 Oct 1;68:47–53.
56. Carbone A, Gloghini A. How immunologic and genetic biomarkers impact hodgkin lymphoma classification, diagnosis, and management: A huge potential that yet needs to be exploited. Vol. 33, International Journal of Biological Markers. SAGE Publications Ltd; 2018. p. 137–40.
57. Lodhi N, Tun M, Nagpal P, Inamdar AA, Ayoub NM, Siyam N, et al. Biomarkers and novel therapeutic approaches for diffuse large B-cell lymphoma in the era of

- precision medicine [Internet]. Vol. 11, *Oncotarget*. 2020. Available from: www.oncotarget.com
58. Tomacinschii V, Mosquera Orgueira A, Santos CA, Robu M, Buruiana S, Fraga Rodriguez MF. The implication of next-generation sequencing in the diagnosis and clinical management of non-Hodgkin lymphomas. Vol. 13, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media SA; 2023.
 59. Ruhe M, Rabe D, Jurischka C, Schröder J, Schierack P, Deckert PM, et al. Molecular biomarkers of DNA damage in diffuse large-cell lymphoma—a review. *J Lab Precis Med*. 2019 Feb;4:5–5.
 60. Alfaifi A, Refai MY, Alsaadi M, Bahashwan S, Malhan H, Al-Kahiry W, et al. Metabolomics: A New Era in the Diagnosis or Prognosis of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. 2023; Available from: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13050861>
 61. Fend F, van den Brand M, Groenen PJTA, Quintanilla-Martinez L, Bagg A. Diagnostic and prognostic molecular pathology of lymphoid malignancies. Vol. 484, *Virchows Archiv*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2024. p. 195–214.
 62. López C, Mozas P, López-Guillermo A, Beà S. Molecular Pathogenesis of Follicular Lymphoma: From Genetics to Clinical Practice. Vol. 3, *Hemato*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2022. p. 595–614.
 63. Shelton V, Detroja R, Liu T, Isaev K, Silva A, Passerini V, et al. Identification of genetic subtypes in follicular lymphoma. *Blood Cancer J*. 2024 Dec 1;14(1).
 64. Rodríguez-Sevilla JJ, Salar A. Recent advances in the genetic of MALT lymphomas. Vol. 14, *Cancers*. MDPI; 2022.
 65. Nakamura S, Hojo M. Diagnosis and Treatment for Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) Lymphoma. Vol. 12, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2023.
 66. Vega F, Amador C, Chadburn A, Hsi ED, Slack G, Medeiros LJ, et al. Genetic profiling and biomarkers in peripheral T-cell lymphomas: current role in the diagnostic work-up. Vol. 35, *Modern Pathology*. Springer Nature; 2022. p. 306–18.
 67. Pileri SA, Tabanelli V, Fiori S, Calleri A, Melle F, Motta G, et al. Peripheral t-cell lymphoma, not otherwise specified: Clinical manifestations, diagnosis, and future treatment. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
 68. 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. Vol. 26, *Clinical and Translational Oncology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2024. p. 1043–62.
 69. Donner I, Katainen R, Kaasinen E, Aavikko M, Sipilä LJ, Pukkala E, et al. Candidate susceptibility variants in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Fam Cancer*. 2019 Jan 15;18(1):113–9.
 70. Abraham Jacob L, Gupta A. DLBCL Subtypes and Prognosis Based on Immunophenotyping. In: *Advances in Hematological Malignancies* [Internet].

- IntechOpen; 2024. Available from:
<https://www.intechopen.com/chapters/85585>
71. Das D. Contribution of immunocytochemistry to the diagnosis of usual and unusual lymphoma cases. In: *Journal of Cytology*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2018. p. 163–9.
 72. Wagner VP, Rodrigues-Fernandes CI, Carvalho MVR, dos Santos JN, Barra MB, Hunter KD, et al. Mantle cell lymphoma, malt lymphoma, small lymphocytic lymphoma, and follicular lymphoma of the oral cavity: An update. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2021 Jul 1;50(6):622–30.
 73. Vega F, Medeiros LJ. A suggested immunohistochemical algorithm for the classification of T-cell lymphomas involving lymph nodes. *Hum Pathol* [Internet]. 2020 Aug;102:104–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004681772030099X>
 74. Lima Cajas RR, Panchi Espin GF, Lalama Rueda RA, Lalama Rueda JE, Pavón Patiño FL, Quincha Muñoz MK. Predictive biomarkers in lymphoma: a systematic research review. *Ibero-American Journal of Health Science Research*. 2024 May 15;4(s):47–56.
 75. Martynchyk A, Chowdhury R, Hawkes EA, Keane C. Prognostic Markers within the Tumour Microenvironment in Classical Hodgkin Lymphoma. Vol. 15, *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
 76. Gholiha AR, Hollander P, Löf L, Larsson A, Hashemi J, Ulfstedt JM, et al. Immune-proteome profiling in classical hodgkin lymphoma tumor diagnostic tissue. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan 1;14(1).
 77. Bertuzzi C, Righi S, Motta G, Rossi M, Carella M, Gabrielli G, et al. Microenvironmental Traits of Classical Hodgkin’s Lymphoma in Adolescents and Their Prognostic Impact. *Cancers (Basel)*. 2024 Dec 1;16(24).
 78. Aoki T, Jiang A, Xu A, Yin Y, Gamboa A, Milne K, et al. Spatially Resolved Tumor Microenvironment Predicts Treatment Outcomes in Relapsed/Refractory Hodgkin Lymphoma. In: *Journal of Clinical Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2024. p. 1077–87.
 79. Jóna Á, Kiss E, Illés Á. Prognostication of Follicular Lymphoma: A Review of Prognostic Scores and Factors. *Diagnostics* [Internet]. 2025 Mar 6;15(5):647. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/15/5/647>
 80. Liang XJ, Song XY, Wu JL, Liu D, Lin BY, Zhou HS, et al. Advances in Multi-Omics Study of Prognostic Biomarkers of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Vol. 18, *International Journal of Biological Sciences*. Ivyspring International Publisher; 2022. p. 1313–27.
 81. Papageorgiou SG, Thomopoulos TP, Katagas I, Bouchla A, Pappa V. Prognostic molecular biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era and their therapeutic implications. Vol. 12, *Therapeutic Advances in Hematology*. SAGE Publications Ltd; 2021.
 82. Pileri SA, Tripodo C, Melle F, Motta G, Tabanelli V, Fiori S, et al. Predictive and Prognostic Molecular Factors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Vol. 10, *Cells*. MDPI; 2021. p. 1–15.

83. Fernández-Castillejo S, Badia J, de la Cruz-Merino L, Martín Garcia-Sáncho A, Carnicero-González F, Palazón-Carrión N, et al. Ketone Bodies Are Potential Prognostic Biomarkers in Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Results from the R2-GDP-GOTEL Trial. *Cancers (Basel)*. 2025 Feb 1;17(3).
84. Turdo A, Gaggianesi M, D'Accardo C, Porcelli G, Di Bella S, Cricchio D, et al. EBF1, MYO6 and CALR expression levels predict therapeutic response in diffuse large B-cell lymphomas. *Front Immunol*. 2023;14.
85. Liu Q, Silva A, Kridel R. Predicting early progression in follicular lymphoma. *Ann Lymphoma*. 2021 Jun;5:11–11.
86. Enemark MH, Hemmingsen JK, Jensen ML, Kridel R, Ludvigsen M. Molecular Biomarkers in Prediction of High-Grade Transformation and Outcome in Patients with Follicular Lymphoma: A Comprehensive Systemic Review. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
87. Shang CY, Wu JZ, Ren YM, Liang JH, Yin H, Xia Y, et al. Prognostic significance of absolute monocyte count and lymphocyte to monocyte ratio in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Ann Hematol*. 2023 Feb 1;102(2):359–67.
88. Wen Q, Li X, Zhao K, Li Q, Zhu F, Wu G, et al. A new prognostic nomogram in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a multicenter retrospective study. *Front Oncol*. 2023;13.
89. Alderuccio JP, Lossos IS. Prognostic factors and risk of transformation in marginal zone lymphoma. *Ann Lymphoma*. 2020 Sep;4:6–6.
90. Yap DRY, Lim JQ, Huang D, Ong CK, Chan JY. Emerging predictive biomarkers for novel therapeutics in peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
91. Ong SY, Zain JM. Aggressive T-cell lymphomas: 2024: Updates on diagnosis, risk stratification, and management. Vol. 99, *American Journal of Hematology*. John Wiley and Sons Inc; 2024. p. 439–56.
92. Wu Y, Zhang Y. Prognostic and clinicopathological value of soluble programmed cell death ligand-1 (sPD-L1) in patients with peripheral T-cell lymphoma: a meta-analysis. *Ann Med*. 2025;57(1).
93. Liu J, Zhang S, Mi R, Chen L, Yin Q. Prognostic significance of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in peripheral T-cell lymphoma: a meta-analysis. Vol. 21, *Cancer Cell International*. BioMed Central Ltd; 2021.
94. Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. Vol. 35, *Chinese Journal of Cancer*. Landes Bioscience; 2016.
95. Song P, Wu LR, Yan YH, Zhang JX, Chu T, Kwong LN, et al. Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics. *Nat Biomed Eng*. 2022 Jan 31;6(3):232–45.
96. Hur JY, Kim YJ, Yoon SE, Son DS, Park WY, Kim SJ, et al. Plasma cell-free DNA is a prognostic biomarker for survival in patients with aggressive non-Hodgkin lymphomas. *Ann Hematol*. 2020 Jun 1;99(6):1293–302.

97. Alderuccio JP, Kuker RA, Yang F, Moskowitz CH. Quantitative PET-based biomarkers in lymphoma: getting ready for primetime. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023 Sep 17;20(9):640–57.
98. Sobesky S, Mammadova L, Cirillo M, Drees EEE, Mattlener J, Dörr H, et al. In-depth cell-free DNA sequencing reveals genomic landscape of Hodgkin's lymphoma and facilitates ultrasensitive residual disease detection. *Med*. 2021 Oct 8;2(10):1171-1193.e11.
99. Cirillo M, Borchmann S. An update on disease biomarkers for Hodgkin lymphoma. *Expert Rev Hematol*. 2020 May 3;13(5):481–8.
100. Kopińska A, Kocłęga A, Francuz T, Helbig G. Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) levels in newly diagnosed patients with Hodgkin lymphoma: a new promising and predictive tool? Preliminary report. *J Hematop*. 2021 Dec 1;14(4):277–81.
101. Buedts L, Wlodarska I, Finalet-Ferreiro J, Gheysens O, Dehaspe L, Tousseyn T, et al. The landscape of copy number variations in classical Hodgkin lymphoma: A joint KU Leuven and LYSA study on cell-free DNA. *Blood Adv*. 2021;5(7):1991–2002.
102. Camus V, Jardin F. pharmaceuticals Cell-Free DNA for the Management of Classical Hodgkin Lymphoma. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2021;14:207. Available from: <https://doi.org/10.3390/ph1403>
103. Lutfi F, Goloubeva O, Kowatli A, Gryaznov A, Kim DW, Dureja R, et al. Imaging Biomarkers to Predict Outcomes in Patients With Large B-Cell Lymphoma With a Day 28 Partial Response by 18F-FDG PET/CT Imaging Following CAR-T Therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2023 Oct 1;23(10):757–63.
104. Alfaifi A, Bahashwan S, Alsaadi M, Malhan H, Aqeel A, Al-Kahiry W, et al. Metabolic Biomarkers in B-Cell Lymphomas for Early Diagnosis and Prediction, as Well as Their Influence on Prognosis and Treatment. Vol. 12, *Diagnostics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2022.
105. Monick S, Rosenthal A. Circulating Tumor DNA as a Complementary Prognostic Biomarker during CAR-T Therapy in B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. Vol. 16, *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
106. Genetic alterations in B cell lymphoma subtypes as potential biomarkers for non-invasive diagnosis, prognosis, therapy, and disease monitoring. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*. 2020;
107. Fernandes M, Marques H, Teixeira AL, Medeiros R. CeRNA network of lncRNA/miRNA as circulating prognostic biomarkers in non-hodgkin lymphomas: Bioinformatic analysis and assessment of their prognostic value in an NHL cohort. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 1;23(1).
108. Khanmohammadi S, Fallahtafti P. Long non-coding RNA as a novel biomarker and therapeutic target in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma: A systematic review. Vol. 27, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 1928–46.

109. El Hussein S, O'Malley DP. Classic Hodgkin lymphoma: An illustrative review of select diagnostic limitations and immunomorphological challenges. *Hum Pathol.* 2025 Feb;156:105678.
110. Roschewski M, Rossi D, Kurtz DM, Alizadeh AA, Wilson WH. Circulating Tumor DNA in Lymphoma: Principles and Future Directions. Vol. 3, *Blood Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 5–15.
111. Hasanabadi S, Aghamiri SMR, Abin AA, Abdollahi H, Arabi H, Zaidi H. Enhancing Lymphoma Diagnosis, Treatment, and Follow-Up Using 18F-FDG PET/CT Imaging: Contribution of Artificial Intelligence and Radiomics Analysis. Vol. 16, *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
112. Velasco-Suelto J, Gálvez-Carvajal L, Comino-Méndez I, Rueda-Domínguez A. Hodgkin lymphoma and liquid biopsy: a story to be told. Vol. 43, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. BioMed Central Ltd; 2024.
113. Huang Z, Fu Y, Yang H, Zhou Y, Shi M, Li Q, et al. Liquid biopsy in T-cell lymphoma: biomarker detection techniques and clinical application. Vol. 23, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd; 2024.
114. Lauer EM, Mutter J, Scherer F. Circulating tumor DNA in B-cell lymphoma: technical advances, clinical applications, and perspectives for translational research. Vol. 36, *Leukemia*. Springer Nature; 2022. p. 2151–64.
115. van Bladel DAG, Stevens WBC, van den Brand M, Kroeze LI, Groenen PJTA, van Krieken JHJM, et al. Novel Approaches in Molecular Characterization of Classical Hodgkin Lymphoma. Vol. 14, *Cancers*. MDPI; 2022.
116. Fu L, Zhou X, Zhang X, Li X, Zhang F, Gu H, et al. Circulating tumor DNA in lymphoma: technologies and applications. Vol. 18, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd; 2025.
117. Alfaifi A, Refai MY, Alsaadi M, Bahashwan S, Malhan H, Al-Kahiry W, et al. Metabolomics: A New Era in the Diagnosis or Prognosis of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. 2023; Available from: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13050861>
118. Liang XJ, Song XY, Wu JL, Liu D, Lin BY, Zhou HS, et al. Advances in Multi-Omics Study of Prognostic Biomarkers of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Vol. 18, *International Journal of Biological Sciences*. Ivyspring International Publisher; 2022. p. 1313–27.
119. Islam SU, Ahmed MB, Ahsan H, Lee YS. Role of Biomarkers in Personalized Medicine. In: *Cancer Biomarkers in Diagnosis and Therapeutics*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2022. p. 249–75.
120. Olejarz W, Sadowski K, Szulczyk D, Basak G. Advancements in Personalized CAR-T Therapy: Comprehensive Overview of Biomarkers and Therapeutic Targets in Hematological Malignancies. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.

121. Raj SS, Fei T, Fried S, Ip A, Fein JA, Leslie LA, et al. An inflammatory biomarker signature of response to CAR-T cell therapy in non-Hodgkin lymphoma. *Nat Med.* 2025;