

**Câncer de mama: Análise da expressão de receptores de ativação e inibição da resposta
imune celular pré e pós quimioterapia neoadjuvante**

*Breast Cancer: activation and inhibition receptor expression analysis in the immune cellular
response of pre and post neoadjuvant chemotherapy*

Francisco Sales de Albuquerque Filho¹; Diego Felipe Ferrão Pereira de Andrade Barros²;
Thómas Virgílio³; Denise Sobral Viana⁴; Marcelo Ramos Tejo Salgado⁴; Leuridan Cavalcante
Torres⁵.

¹ Aluno de graduação do curso de Medicina da Faculdade Pernambucana de Saúde e bolsista do
Programa de Iniciação Científica-PIBIC IMIP/CNPq

² Aluno de graduação do curso de Medicina da Faculdade Pernambucana de Saúde

³ Laboratório de Pesquisa Translacional, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
(IMIP), Recife, Brazil.

⁴ Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer de Pernambuco - Hospital de Câncer de
Pernambuco, Recife, Brasil.

⁵ Doutora em Imunologia pela Universidade de São Paulo (USP), Docente da Pós-graduação
stricto sensu do IMIP

***Autor correspondente:**

Leuridan Cavalcante Torres, PhD

Instituto de Medicina Integra Prof. Fernando Figueira (IMIP),

Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Rua dos Coelhos, 300. Boa Vista

CEP 50070-550

Telefone: 81 98659 6766

E-mail: leuridan.torres@gmail.com

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a resposta imune celular em pacientes com o diagnóstico de câncer de mama (CM). **MÉTODOS:** Foi realizada a análise de pacientes com diagnóstico de CM, subtipos HER-2, Luminal A, Luminal B, Triplo Negativo (TN). O estudo foi realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP no período de agosto de 2015 a julho de 2016. Para análise da resposta imune celular, foi realizada a imunofenotipagem das células T (CD3⁺), TCD4⁺, TCD8⁺, e de receptores de ativação CD28⁺ e de inibição CTLA-4⁺ e FAS⁺ por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CTLA4, anti-CD95, e anti-CD28. Testes não paramétricos foram usados para comparar variáveis numéricas com distribuição não normal entre grupos: teste U de *Mann-Whitney*. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$. Toda a análise estatística foi realizada através do *GraphPad Prism* v6.0. **RESULTADOS:** Nas análises da expressão de receptores CD28⁺, CTLA4 e FAS na superfície de linfócitos T nos 4 subtipos de CM, verificou-se que não houve diferença estatística significativa destes receptores entre os grupos. Nas análises pré e pós tratamento quimioterápico neoadjuvante nos níveis percentuais de células T total (CD3⁺), TCD4⁺, TCD8⁺, verificou-se diminuídos percentuais de linfócitos T totais pós quimioterapia ($p < 0.0001$). Na análise da expressão de FAS nas populações TCD3⁺ e TCD4⁺, observou-se aumento dos valores relativos da expressão de FAS no período pós-tratamento ($p < 0.0001$). Contudo, não houve diferença significativa na análise das células TCD8⁺FAS⁺ entre os grupos pré e pós-tratamento. Em relação ao marcador CTLA-4, foi observado um aumento dos valores relativos de células TCD4⁺/CTLA4⁺ e de TCD8⁺/CTLA-4⁺ (* $p < 0.0410$ e $p < 0.0001$, respectivamente) pós tratamento quimioterápico. As pacientes com CM apresentam valores relativos diminuídos de TCD4⁺/CD28⁺ e TCD8⁺/CD28⁺ pós tratamento ($p < 0.0001$ e $p < 0.0130$, respectivamente). **CONCLUSÃO:** Conclui-se que no câncer de mama, o tratamento quimioterápico modula a resposta imune celular com o aumento de receptores de inibição de linfócitos T e com isso, aumento os níveis de apoptose celular.

Palavras-chaves: Câncer de Mama, Células T, Ativação, Inibição e apoptose.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Evaluate the cellular immune response in patients diagnosed with breast cancer (BC). **METHODS:** Analysis was conducted in patients diagnosed with BC, molecular subtypes HER2+, Luminal A, Luminal B and Triple Negative (TN). The study was conducted at the Pernambuco Cancer Hospital (HCP) and at the IMIP's Laboratory of Translational Research, between August of 2015 and July 2016. Immunophenotyping of T cells (TCD3⁺), TCD4⁺ and TCD8⁺, and T cell activation CD28⁺, inhibition CTLA-4⁺ and FAS⁺ receptors was done by flow cytometry, applying the monoclonal antibodies anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CTLA-4, anti-CD95, and anti-CD28. The Mann-Whitney's U test was utilized to compare the groups, which were non-normally distributed. A statistical significance of $P < 0.05$ was adopted. The statistical analysis was conducted in the *GraphPad Prism* v6.0. **RESULTS:** CD28⁺, CTLA-4⁺ and FAS⁺ receptors expression analysis on T lymphocyte surface in the four BC subtypes did not show a statistical significance of these receptors between groups. Pre and post neoadjuvant chemotherapy treatment analysis showed lower total T lymphocyte relative values in the post chemotherapy group ($p < 0.0001$). FAS⁺ expression analysis in the TCD3⁺ and TCD4⁺ showed elevated relative values in the post chemotherapy group ($p < 0.0001$). However, the TCD8⁺FAS⁺ cells of the pre and post chemotherapy groups were not statistically different. Concerning the CTLA-4⁺ biomarker, it was observed an enhancement in the relative values of TCD4⁺/CTLA-4⁺ and TCD8⁺/CTLA-4⁺ (* $p < 0.0410$ e $p < 0.0001$, respectively) in the post chemotherapy group. The patients with BC showed diminished relative values of TCD4⁺/CD28⁺ and TCD8⁺/CD28⁺ ($p < 0.0001$ e $p < 0.0130$, respectively) in the post chemotherapy group. **CONCLUSION:** In the breast cancer, the chemotherapeutic treatment modulates the immunological cellular response, enhancing inhibitory T lymphocyte receptors, and, therefore, amplifying the cellular apoptosis levels.

Keywords: Breast Cancer, T cells, activation, inhibition and apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

Câncer de Mama (CM) permanece como a neoplasia maligna mais comum entre mulheres no mundo, acometendo indivíduos em diferentes faixas etárias, sendo mais frequente em mulheres acima dos 50 anos. Trata-se de uma doença muito heterogênea na apresentação clínica, história natural, prognóstico e resposta ao tratamento. Aproximadamente 1.38 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama em 2008 (1).

A taxa de incidência é maior em regiões economicamente desenvolvidas como EUA, Europa Ocidental e Austrália, e baixa em regiões economicamente subdesenvolvidas como África e algumas partes da Ásia (2). As taxas de incidência de Câncer de mama em regiões desenvolvidas aumentaram entre 1980-90 devido a aumento no *screening* desta neoplasia e mudanças em fatores reprodutivos. Desde 2000, a incidência de CM tem diminuído nestas regiões desenvolvidas, em virtude da diminuição da terapia de reposição hormonal (2).

No Brasil está é a neoplasia maligna mais frequente, excluindo câncer de pele não melanoma. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016) esperamos 300.870 novos casos de neoplasia na população feminina, sendo 57.960 deste por CM em 2016, assim distribuídos: na região sudeste (29.760), Sul (10.970) Centro-Oeste (4.230), Nordeste (11.190) e Norte (1.810). Para Pernambuco foram estimados 2.550 novos casos (3).

O CM está relacionado a fatores reprodutivos e hormonais, pode ser de causa esporádica, na sua maioria, ou familiar com presença de alterações genéticas. A incidência varia com a idade, sendo mais freqüente em mulheres acima dos 50 anos. Alguns fatores de risco já estão bem estabelecidos como menarca precoce e menopausa tardia, nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos, terapia de reposição hormonal, entre outros (4). Tem vários tipos patológicos, sendo o carcinoma ductal e o carcinoma lobular responsável por 90% dos casos (4).

O CM apresenta maior chance de cura quando diagnosticado precocemente, a mortalidade está diretamente relacionada a características morfológicas (envolvimento

linfonodal, tamanho, tipo histopatológico, grau histológico e invasão angiolinfática), e biológicas do tumor (receptor estrógeno, progesterona, HER-2). Além disso, tem-se relatado a importância da resposta imunológica no desenvolvimento e no prognóstico dos cânceres (5).

O sistema imunológico ao realizar a função de vigilância imunológica e a todo momento, inúmeras células são produzidas e outras se tornam ineficazes, quando isto ocorre, estas células começam a expressar co-inibidores que levam ao processo de apoptose celular. Os mecanismos de apoptose, geralmente, acontecem com a finalidade de manter a homeostase do sistema imune. Contudo, durante o processo da resposta imune anti-tumoral, com a formação de microambientes tumorais pode ocorrer uma disfunção dos mecanismos pró-apoptóticos em prol da proliferação de células tumorais e redução da ativação de células T, sendo este um dos mecanismos de escape da resposta imune (6,7).

A apoptose, também denominada de morte celular programada, pode ser induzida por duas vias: a intrínseca e a extrínseca. A seleção da via irá depender dos marcadores de superfícies (*e.g.*: receptores) expressos pela célula alvo. Um desses receptores é o FAS, uma proteína da superfície celular pertencente à família do Fator de Necrose Tumoral, que interage com seu ligante (FAS-L), dando início a uma sequência de ativações que leva a apoptose celular(8).

Além de sua função apoptótica, o FAS também atua no crescimento e regeneração celular, sendo essa função bem relatada nos tecidos hepáticos, renais e neuronais. Nas células tumorais, tem-se a expressão do FAS-L que na sua forma ativa promove a manutenção e propagação da oncogênese, por inibição da resposta imune celular(9).

No câncer de mama, há um *up-regulation* da expressão do FAS-L, levando a crer que este tem um papel importante na gênese tumoral. Estudos recentes demonstraram que o FAS-L pode ser localizado no citoplasma e na membrana de células tumorais, além de também estar presente nos tecidos glandulares “normais” ao redor. (8).

Células T *naive* expressam em suas membranas, constitutivamente, a molécula coestimuladora CD28, que pós apresentação antigênica pelas células apresentadoras de antígeno (APC - *antigen presenting cell*) junto ao receptor de células T (TCR - *T cell receptor*), iniciam a resposta da célula T, tornando-a efetora. Uma vez que a célula efetora se torna ativa, a célula T começa a expressar níveis progressivos de CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*) em sua membrana. A proteína CTLA-4 pertence à superfamília das moléculas CD28, e, por isso, liga-se ao mesmo receptor (B7-1 ou B7-2) nas APCs, porém, com maior afinidade e avides. É também expressa na superfície de células T reguladoras (T_{Reg} - células T que inibem a resposta imune), e possui papel essencial na inibição de respostas das células T. (7,10).

Os mecanismos responsáveis pelo início do processo de competição com as moléculas de CD28, mediada por ação da CTLA4, ainda são pouco conhecidos. Contudo, existem hipóteses, dentre as quais duas se destacam, sobre quais seriam tais mecanismos, sendo: (1) pós a ligação da molécula CTLA4 com o receptor B7, além do bloqueio a ligação com CD28, ocorre também a (2) endocitose dos receptores B7, resultando em diminuição da disponibilidade de receptores B7 livres (7,10).

Deste modo, o presente estudo avaliou a expressão de receptores de ativação (CD28) e de inibição celular (FAS, CTLA-4) nos linfócitos T totais (CD3⁺), TCD4⁺ e TCD8⁺ em pacientes com câncer de mama de subtipos HER2+, Luminal A, Luminal B e TN pré e pós tratamento quimioterápico neoadjuvante.

2. MÉTODOS

2.1 Pacientes

Foram incluídas 60 mulheres com idade acima de 18 anos com diagnóstico de câncer de mama e atendidas no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP), pré e pós o tratamento quimioterápico neoadjuvante (QT-NEO) com as drogas Adriamicina, Ciclofosfamida, seguidas de Paclitaxel. Destas, 13 com diagnóstico de câncer de mama subtipo luminal A, 9 luminal B, 20 HER2⁺, 18 pacientes com câncer de mama triplo negativo (TN). Das 60 pacientes, 28 realizaram todos os ciclos do tratamento neoadjuvante. As amostras de sangue periférico foram coletas no momento do diagnóstico, e pós tratamento quimioterápico. Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP. Os protocolos clínicos e laboratoriais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CAAE: 18418713.4.0000.5201) e do HCP (CAAE: 18418713.4.3001.5205). O consentimento informado foi obtido de todas as participantes pré do início do estudo. O diagnóstico imuno-histoquímico do câncer de mama foi realizado segundo padrão internacional de acordo com *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (11).

Todas as pacientes com diagnóstico clínico de câncer de mama foram avaliadas quanto ao preenchimento dos critérios de inclusão e exclusão. Foram excluídos do estudo: Histologia compatível com Sarcoma, Linfoma ou outros tipos de Carcinoma (Tubular, Mucinoso, Medular, Metaplásico, Micropapilar, Túbulo lobular ou Adenóide Cístico); metástases à distância diagnosticados por método de imagem, gestação e lactação; co-morbidades graves que contra-indique o uso de quimioterapia; neoplasia prévia, exceto câncer de pele não melanoma.

2.2 Imunofenotipagem de células T

Para realizar a imunofenotipagem de sangue periférico por citometria de fluxo, utilizando o Citômetro de Fluxo (BD FACSVerserTM). Os seguintes anticorpos monoclonais

foram utilizados: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD28, anti-CD95, anti-CD95L e anti-CTLA-4. A análise das amostras foi realizada por meio BD FACSVerse™ (BD Biosciences) e o resultado das populações celulares foi expresso em valores relativos (%).

2.3 Análise de dados

Para análises estatísticas, foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para a análise da distribuição das variáveis numéricas. Foi utilizado o teste de *Mann Whitney* (não paramétrico) e Teste *T student* paramétrico para análise entre grupos. Foi considerado significativo $P < 0.05$. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prisma V. 6.0.

3. RESULTADOS

3.1 Análises da expressão de FAS, CTLA-4 e CD28 nos subtipos tumorais

Foi realizada análise de expressão de FAS, CTLA-4 e CD28 na superfície de linfócitos TCD4+ e TCD8+ nos subtipos HER2+, Luminal A e B, e TN, verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos de CM, mostra a figura 1.

3.2 Análises dos valores relativos de linfócitos T totais, TCD4+ e TCD8+ pré e pós tratamento neoadjuvante

As pacientes com CM apresentaram valores relativos diminuídos de linfócitos T totais (TCD3+) pós QT-NEO ($p < 0.0001$), como mostra a **Figura 1**. Verificou-se que não houve diferença significativa dos valores relativos de linfócitos TCD4+ e TCD8+ pré e pós QT-NEO.

3.3 Análises da expressão de FAS nos linfócitos T pré e pós-tratamento QT-NEO

Foi realizada a análise de 28 pacientes com CM pré e pós QT-NEO, e observado aumento de expressão de FAS nos linfócitos TCD3+ e TCD4+ pós-tratamento QT-NEO ($p < 0.0001$) (**Figura 3**). Contudo, na análise dos linfócitos TCD8+/FAS⁺ não foi evidenciada diferença estatística entre as fases pré e pós QT-NEO.

3.4 Análises de receptores CTLA-4 e CD28 nos linfócitos T pré e pós tratamento QT-NEO

Na análise da expressão de CTLA-4 em linfócito T, foi observado um aumento dos valores relativos TCD4⁺/CTLA4 e TCD8⁺ /CTLA-4 (*p < 0.0410 e p < 0.0001, respectivamente) entre os grupos pré e pós QT-NEO (**Figura 4**).

Na análise de expressão de CD28, verificou-se valores relativos diminuídos de TCD4⁺ /CD28+ e TCD8⁺/CD28+ (p < 0.0001 e p < 0.0130, respectivamente), como mostra a **Figura 4A e 4C**.

4. DISCUSSÃO

Nas células T, a expressão de moléculas de inibição e ativação, denominadas de *checkpoints* imunológicos, vem recebendo maior atenção no câncer, a exemplo da molécula CD28, que após a apresentação do antígeno às células T, na qual ocorre ativação da célula T e um aumento da resposta inflamatória. Além da maior afinidade, a capacidade proliferativa das células T depende amplamente em sinais de co-estimulação, como os do CD28, que é expresso nas membranas das células T, e de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-2 e a IL-12 (12). No contexto dos processos neoplásicos há uma redução da expressão do CD28, levando a uma inibição da ativação das células T, e, conseqüentemente, uma maior proliferação de células tumorais (7). Contudo, no presente trabalho, foi observado uma redução da expressão das moléculas CD28 pós-tratamento QT-NEO, que pode ser justificada pelo aumento da expressão de moléculas CTLA-4, o que sugere um aumento dos mecanismos de anergia de células T.

O CTLA-4 é um *checkpoint* engajado principalmente em direcionar a resposta imune via a redução da atividade das células TCD4⁺ efetoras, em particular das TCD4⁺ auxiliares, e o aumento da atividade das células T_{Reg}. A diminuição da função das células TCD4⁺, induz uma

comprometimento da ativação das células TCD8⁺, as quais são imprescindíveis à resposta imune celular anti-tumoral (7,13).

As células TCD4⁺ possuem maior expressão de CTLA-4, contudo, a expressão de CTLA-4 em células TCD8⁺ vem sendo associado à resposta clínica favorável em pacientes tratados com imunoterapia (14). A elevação da expressão de CTLA-4 no pós-QT-NEO, como visto no presente trabalho nas células TCD4⁺ e TCD8⁺, pode ser sugestivo a um prognóstico clínico favorável. Tal ponto foi observado em estudo recente, no qual a expressão de moléculas co-inibidoras, como o CTLA-4 nas células TCD8⁺, não seria necessariamente uma molécula que promova a redução da função das células T, mas uma diferente subpopulação de células T ativadas associadas a um prognóstico clínico favorável (14).

A redução da expressão de células T CD3 foi acompanhada do aumento da expressão de FAS no câncer de mama. Achado similar já foi relatado em outros tipos tumorais, como câncer de pâncreas. Porém, ainda não está elucidado o fato de alguns tipos tumorais não aumentarem os níveis de FAS em células T no período pós-QT-NEO, sendo esse achado associado ao pior prognóstico, pois em estágios mais avançados ocorre a expressão reduzida de FAS. Essa relação entre a redução de TCD3 e o aumento na expressão de FAS pode ser explicada pela possível ação moduladora antitumoral (15,16).

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que no câncer de mama, o tratamento quimioterápico modula a resposta imune celular com o aumento de receptores de inibição de linfócitos T e com isso, os níveis de apoptose celular.

REFERÊNCIA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2011 [cited 2016 Aug 18];61(2):69–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296855>
2. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Apr 19 [cited 2016 Aug 18];356(16):1670–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442911>
3. INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016 [Internet]. 2016 [cited 2016 Aug 20]. Available from: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tbregioes_consolidado.asp
4. Schottenfeld D, Fraumeni JF. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3rd ed. Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. Oxford University Press; 2006. 1392 p.
5. Kitamura T, Qian B-Z, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Research; 2015 Jan 23 [cited 2016 Aug 20];15(2):73–86. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3789>
6. Speiser DE, Ho P, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.80>
7. Abbas, Abul K. Lichtman, Andrew H. H., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2014.
8. Peter ME, Hadji a, Murmann a E, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak a, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;22(4):549–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2015.3>
9. Delves PJ. *Innate and Adaptive Systems of Immunity* [Internet]. The Autoimmune Diseases, 5e. Elsevier Inc.; 2014. 53-68 p. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849298000058>
10. Carlo MI, Voss MH, Motzer RJ. Checkpoint inhibitors and other novel. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2016.103>
11. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual*. Springer; 2010. 648 p.
12. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK. Clinical relevance of host immunity in breast cancer : from TILs to the clinic. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;13(4):228–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.215>
13. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. Nature

Research; 2016 Apr 15 [cited 2016 Aug 20];16(5):275–87. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc.2016.36>

14. Bernal-Estévez D, Sánchez R, Tejada RE, Parra-López C. Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient. *BMC Cancer* [Internet]. BioMed Central; 2016 [cited 2016 Aug 20];16:591. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27484900>
15. Nolen BM, Marks JR, Ta'san S, Rand A, Luong TM, Wang Y, et al. Serum biomarker profiles and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2008 [cited 2016 Aug 21];10(3):R45. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474099>
16. Kadam CY, Abhang SA. Serum levels of soluble Fas ligand, granzyme B and cytochrome c during adjuvant chemotherapy of breast cancer. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2016 Aug 21];438:98–102. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139496>

FIGURAS

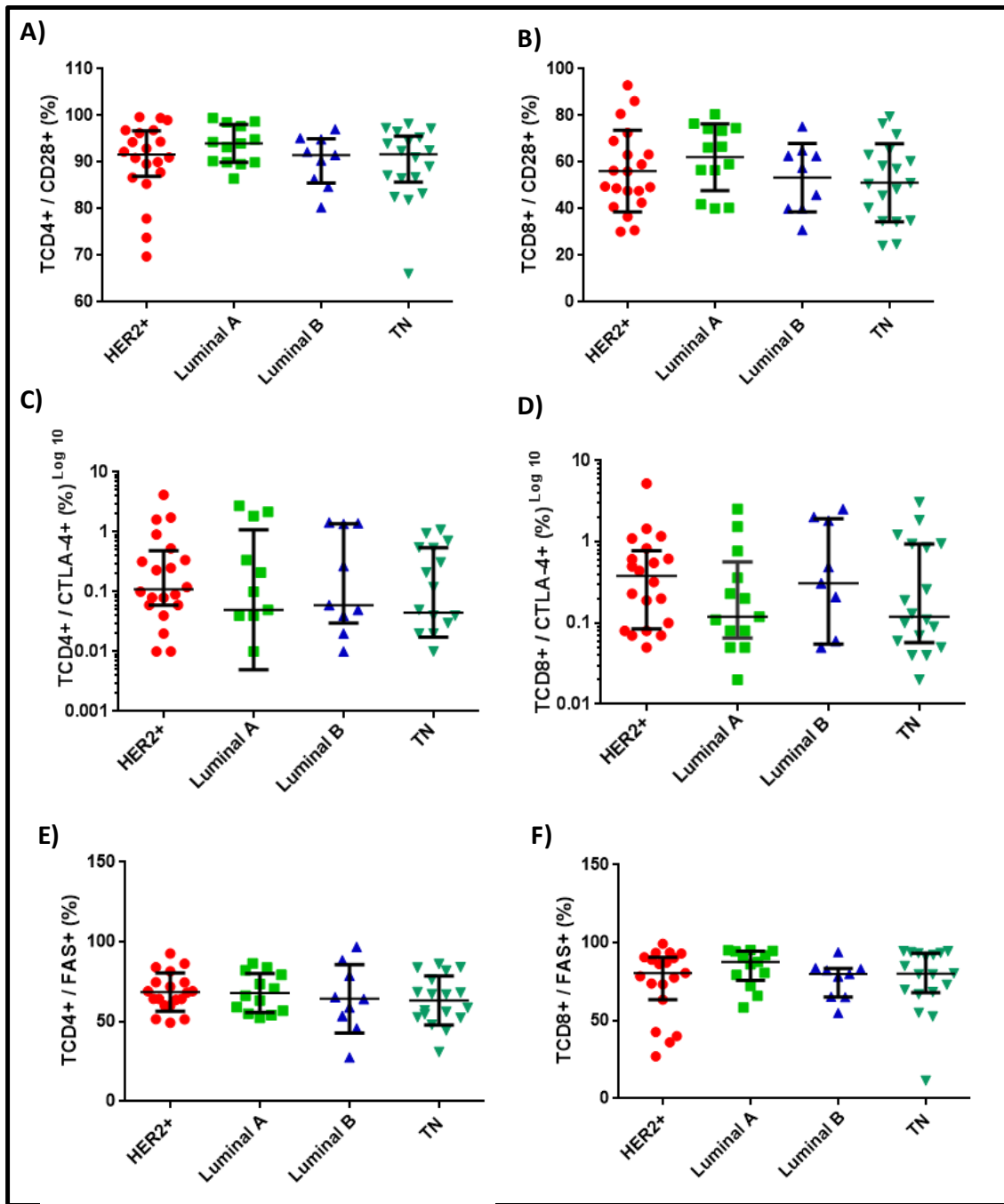


Figura 1: Análise dos valores relativos (%) de linfócitos TCD4+/CD28+ (A), TCD8+/CD28+ (B), TCD4+/CTLA4+ (C), TCD8+/CTLA-4+ (D), TCD4+/FAS+ (E) e TCD8+/FAS+ (F) nos subtipos de CM HER2+, Luminal A e B, e Triplo negativo (TN). Gráficos representados pela mediana e interquartil (25 – 75)

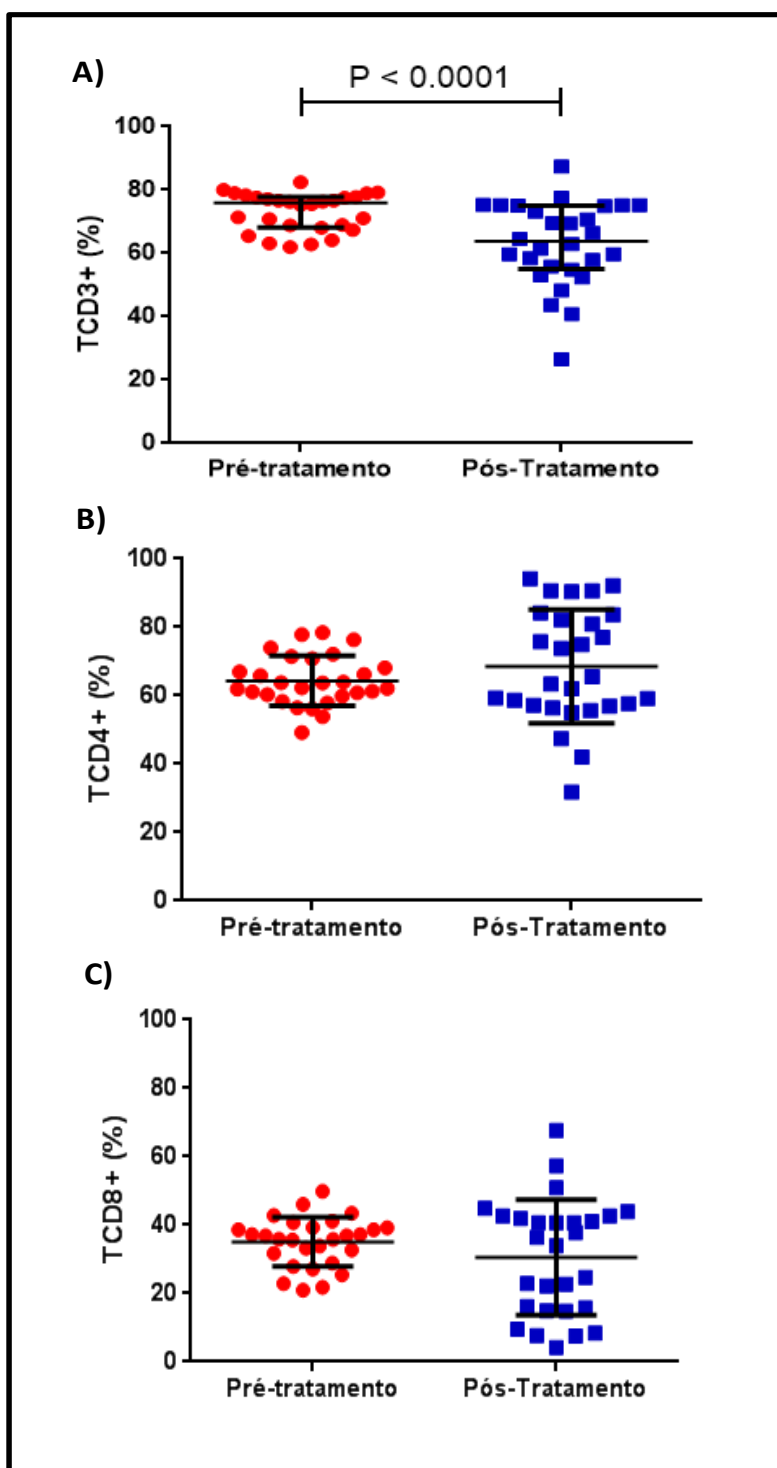


Figura 2 – Análises dos valores relativos de linfócitos totais - TCD3⁺ (A), TCD4⁺(B) e TCD8⁺ (C) de 28 pacientes com CM ante e pós QT-NEO. Foi realizada o teste de Mann Whitney para análise entre os grupos. Foi considerado significativo $P < 0.05$. Gráficos representados pela mediana e interquartil (25 – 75).

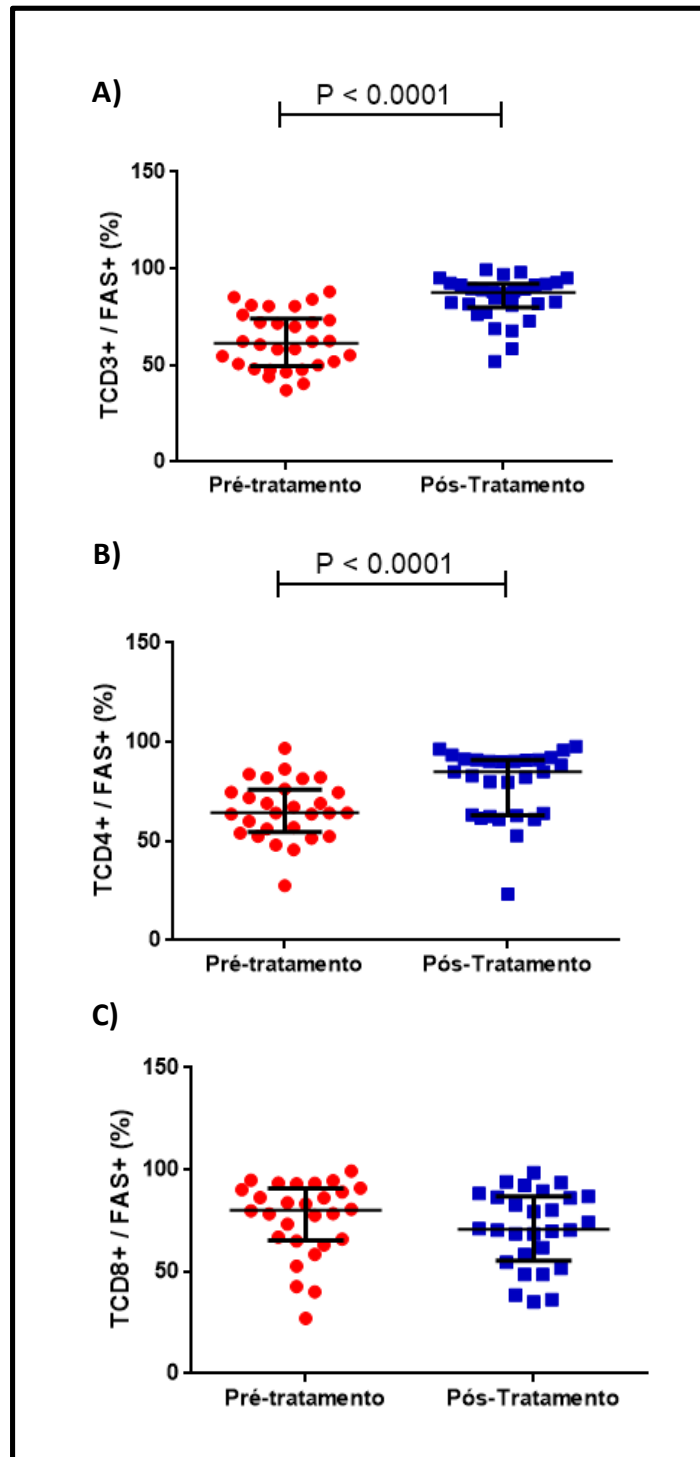


Figura 3 – Análises dos valores relativos linfócitos TCD3⁺/FAS+ (A), TCD4⁺ /FAS+ (B) e TCD8⁺ /FAS+ (C) de 28 pacientes com CM ante e pós QT-NEO. Foi realizada o teste de Mann Whitney para análise entre os grupos. Foi considerado significado $P < 0.05$. Graficos representados pela mediana e interquartil (25 – 75)

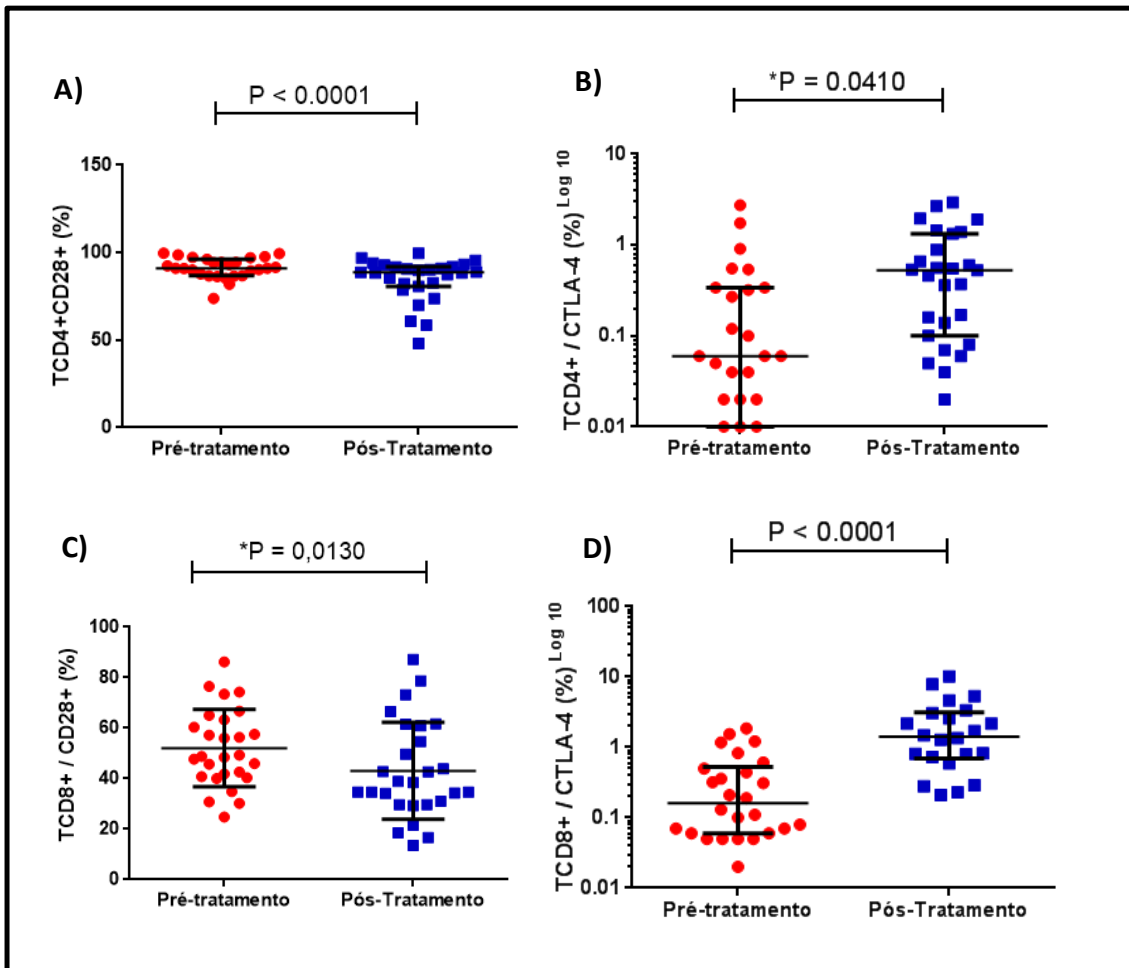


Figura 4 – Análises dos valores relativos linfócitos TCD4⁺/CD28⁺ (A), TCD4⁺/CTLA-4⁺ (B), TCD8⁺/CD28⁺ (C) e TCD8⁺/CTLA-4 (D) de 28 pacientes com CM ante e pós QT-NEO. Foi realizada o teste *T student* (paramétrica) para análise entre os grupos. Foi considerado significativo $P < 0.05$. Gráficos representados pela média e desvio padrão.