

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE OX40 E CD40L EM LINFÓCITOS CIRCULANTES NO CÂNCER DE MAMA EM MULHERES IDOSAS ANTES E APÓS QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

ANALYSIS OF OX40 AND CD40L EXPRESSION IN CULTURAL LYMPHOCYTES IN BREAST CANCER IN ELDERLY WOMEN BEFORE AND AFTER NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

Clara Cínthia Resende Lira ¹; Evandro Bezerra Cintra Junior ¹; Leuridan Cavalcante Torres²; Maria de Fátima Silva de Lima Kauffman²

¹ Faculdade pernambucana de saúde, Rua Jean Emile Favre, 422. Imbiribeira, Recife, PE, Brasil. CEP: 51200-060. Email: clararlira@gmail.com

² Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira. Rua dos Coelhoos, 300 - Boa Vista, Recife – PE. CEP: 50070-550.

Reconhecimento de apoio ao estudo: CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI).

Autor correspondente: Clara Cínthia Resende Lira

Telefone pessoal: (81) 99948-8985

E-mail: clararlira@gmail.com

Os autores negam quaisquer conflitos de interesse no desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

Objetivo: analisar o perfil da expressão de OX40 e CD40L em linfócitos de pacientes idosas (≥ 60 anos) com câncer de mama (CM) antes e após tratamento quimioterápico.

Métodos: entre 2015 e 2017, um estudo de coorte prospectivo foi realizado em 16 idosas com CM e 56 idosas saudáveis (controles). Para a análise de OX40 e CD40L, foi coletado sangue periférico das pacientes no momento da admissão ao serviço e até 30 dias após início do tratamento quimioterápico e dos controles. O estudo foi realizado utilizando a técnica de citometria de fluxo e a análise estatística foi realizada com GraphPad Prism.

Resultados: a idade média das pacientes idosas com CM foi 69,4 anos ($\pm 7,5$) e dos controles 71,5 anos (± 8). Foi observada elevada expressão de OX40 em linfócitos nas pacientes com CM antes e após tratamento, em comparação com os controles ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente). Como também no agregado plaquetário (AGP) em linfócitos nas pacientes antes e após tratamento em comparação com os controles ($p < 0,0001$; $p = 0,0179$, respectivamente). Não houve diferença significativa na expressão de CD40L em linfócitos e no AGP em linfócitos nas pacientes em comparação com os controles. **Conclusão:** O OX40 e o CD40L podem ser possíveis biomarcadores preditivos de prognóstico e de resposta clínica e patológica no câncer de mama em idosas.

Palavras chave: câncer de mama, CD40L, OX40, oncologia, geriatria.

ABSTRACT

Objective: To analyze the profile of OX40 and CD40L expression in lymphocytes of elderly (≥ 60 years) breast cancer (BC) patients before and after chemotherapy. **Methods:** Between 2015 and 2017, a prospective cohort study was conducted on 16 elderly women with BC and 56 healthy elderly women (controls). For the analysis of OX40 and CD40L, BC patients' peripheral blood was collected at admission and 35 days after starting chemotherapy and controls'. The study was performed using the flow cytometry technique and statistical analysis was performed with GraphPad Prism. **Results:** the mean age of BC patients was 69.4 years (± 7.5) and of controls was 71.5 years (± 8). Elevated OX40 expression was observed in lymphocytes in BC patients before and after treatment, compared to controls ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$; respectively). As well as in the platelet aggregate (PA) in lymphocytes in patients before and after treatment compared to controls ($p < 0.0001$, $p = 0.0179$, respectively). There was no significant difference in CD40L expression in lymphocytes and in PA in lymphocytes in patients compared to controls. **Conclusion:** OX40 and CD40L may be possible biomarkers predictive of prognosis and clinical and pathological response in breast cancer in the elderly.

Key words: breast cancer, CD40L, OX40, oncology, geriatrics.

INTRODUÇÃO

O Câncer de Mama (CM) constitui a maior causa de morte por câncer entre mulheres no mundo e permanece como a segunda neoplasia maligna mais comum nesse grupo, respondendo por cerca de 25% dos casos novos de câncer a cada ano. A idade avançada é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença, sendo também um importante fator preditivo de mortalidade, visto que na população feminina abaixo de 40 anos, ocorrem menos de 10 óbitos a cada 100 mil mulheres, enquanto na faixa etária a partir de 60 anos o risco é 20 vezes maior^{1,2}.

O acúmulo de danos teciduais ao longo da vida, advindo de processos infecciosos e da exposição a agentes que causam mutação pode favorecer o desenvolvimento do câncer³. Associado a isso, ainda temos as alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, sendo fundamentais no processo de envelhecimento⁴. Além disso, essas alterações afetam as funções do sistema imune, o que pode levar à carcinogênese relacionada à idade⁵. Portanto, o envelhecimento promove alterações dos mecanismos da resposta imune inata e adaptativa, sendo denominadas de imunossenescência⁶. Três razões principais podem ser sugeridas para a imunossenescência: (i) involução tímica resultando em redução drástica da produção de células T naïve⁷; (ii) mudanças na composição da membrana celular e / ou dano resultando em alteração da sinalização celular⁸ e (iii) história imunológica, ou seja, excesso de estimulação antigênica ao longo da vida (patógenos, parasitas, possivelmente câncer), que pode resultar em “exaustão imune”⁹.

Há muito tempo se reconhece a relação entre competência imunológica e evolução favorável da doença neoplásica. A imunoterapia para o câncer representa uma abordagem promissora, que pode complementar as terapias existentes com o objetivo de eliminar as células tumorais residuais, através da sua segmentação seletiva por células efetoras imunes ou anticorpos¹⁰.

Recentemente, a imunoterapia baseada no uso de anticorpos monoclonais que ativam receptores agonistas da resposta imune atraiu a atenção dos pesquisadores pelo sucesso no controle do crescimento tumoral em modelos animais¹¹. Nesse contexto, as moléculas OX40 e o ligante de CD40 (CD40L) têm chamado muita atenção devido ao seu potencial na ativação e proliferação dos linfócitos T^{12,13,14}.

O CD40L é uma proteína transmembrana expressa principalmente por células T CD4+ ativadas e plaquetas. Essa molécula interage com seu receptor CD40, expresso em linfócitos B, macrófagos e células dendríticas que são células apresentadoras de antígenos (APC)^{12,13}. Essa interação emite sinais que resultam na ativação e diferenciação das APCs, na potencialização da ativação dos linfócitos T e consequente proliferação e diferenciação dos mesmos^{14,15,16}. Nos linfócitos B, os sinais emitidos pela interação CD40-CD40L são essenciais para ativação da resposta imune humoral a antígenos T-dependentes¹⁷.

CD40L tem uma grande contribuição para a atividade imunológica. No entanto, muitos relatos apontam para sua natureza ambivalente em doenças neoplásicas. Estudos revelaram que o CD40L melhora a resposta imune antineoplásica, inibindo o crescimento tumoral e induzindo a apoptose das células cancerosas. Contudo, relatos subsequentes sugeriram que, em muitos tipos de câncer, a ativação de CD40 por seu ligando resulta em uma situação completamente inversa, aumentando o crescimento e a progressão do tumor¹⁸.

O OX40 (CD134) é uma proteína transmembrana pertencente à família de receptores do fator de necrose tumoral expressa em células T CD4+ e CD8+ ativadas¹⁹. O engajamento de OX40 pelo seu ligante (OX40L) expresso pelas células apresentadoras de antígeno (APC) gera sinais de natureza estimuladora que aumentam a proliferação de

células CD4 + e CD8 +, estimulam a produção de citocinas e promovem a sobrevivência de células T de memória²⁰.

Evidências crescentes sugerem que a interação do OX40 ao seu ligante pode aumentar a resposta imune antitumoral. Ramstad T. et al (2000) sugeriram que células que expressam OX40 podem estar envolvidas na resposta antitumoral a alguns subtipos moleculares de câncer de mama²¹.

OX40 e CD40L estão intimamente associados à imunidade tumoral. No entanto, a literatura ainda é escassa em estudos que avaliem a expressão dessas moléculas em leucócitos do sangue periférico de pacientes idosos com câncer de mama. O presente estudo teve como objetivo analisar o perfil da expressão de OX40 e CD40L em linfócitos de pacientes idosos (≥ 60 anos) com câncer de mama antes e após tratamento quimioterápico.

MÉTODOS

O estudo compreendeu um total de 16 pacientes idosas com idade acima de 60 anos, diagnosticadas com câncer de mama. Dessas pacientes, seis foram diagnosticadas com o subtipo molecular Triplo negativo e dez com Luminal A e Luminal B. Foram incluídas todas as pacientes elegíveis que concordaram em participar do estudo. Como grupo controle, foram incluídas 56 mulheres idosas com idade acima de 60 anos, sem história pregressa ou familiar de câncer e assintomáticas.

Foram incluídos os pacientes que tinham capacidade de aceitar voluntariamente a participação no estudo, diagnóstico de câncer de mama confirmado por histopatológico, citologia ou imuno-histoquímica e pacientes não submetidos a tratamento oncológico prévio, exceto cirúrgico. Foram excluídos pacientes com impossibilidade de avaliar com clareza sua participação na pesquisa (desorientação e distúrbios psiquiátricos), infecção prévia no momento da admissão no serviço de oncologia, pacientes com diagnóstico prévio de câncer, exceto câncer de pele tipo basocelular ou epidermóide não metastático, pacientes com tratamento prévio de câncer, exceto cirurgia e pacientes que evoluíram para o óbito em até 24 horas após a admissão do estudo.

O estudo foi realizado no Serviço de Oncologia Clínica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Os testes laboratoriais foram realizados no Laboratório de Pesquisa Translacional no IMIP. O período de coleta de dados e de amostra biológica foi de novembro de 2016 a abril de 2017. Foi realizada coleta de amostra de sangue periférico no diagnóstico e até 30 dias após primeiro ciclo de quimioterapia padrão após aprovação Comitê de Ética do IMIP (CAAE 14925113.9.0000.5201).

I. Análise de OX40 e CD40L por citometria de fluxo

Para a determinação da expressão de OX40 e CD40L na superfície celular, uma alíquota de 100 μ L de sangue periférico foi adicionado a 2 mL de tampão de lise de hemácias (FACS® Lysing Buffer, Becton Dickinson, CA) e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada lavagem com 2 mL de PBS e posteriormente adicionado 5 μ L dos anticorpos monoclonais anti-CD40L e anti-CD134 (OX40) que foi incubada à temperatura ambiente e protegido da luz por 20 minutos. Após duas etapas de lavagem, foi feita a aquisição em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD, Pharmingen®, San Diego, CA). A análise dos resultados foi realizada no FACSuite (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressa em valores percentuais.

II. Análise Estatística

A análise de dados foi realizada em GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade. Utilizou-se o teste de Mann-Whitney (não paramétrico) para analisar as diferenças entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Foi realizada também uma análise pareada, contudo os resultados encontrados foram os mesmos da análise de grupos (dados não mostrados).

RESULTADOS

Foi realizada a análise de OX40 e CD40L nas pacientes idosas antes e após o tratamento quimioterapia neoadjuvante e de mulheres idosas sem câncer (controles). A idade média das pacientes idosas com câncer de mama foi 69,4 anos ($\pm 7,5$ anos) e dos controles foi de 71,5 anos (± 8 anos).

Verificou-se elevada média nos valores percentuais de OX40 em linfócitos nos pacientes antes (3,4%) e após (4,2%) do tratamento quimioterápico quando comparados aos controles (0,85%; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente; Figura 1C). Não houve diferença significativa nos valores percentuais de linfócitos/OX40+ em pacientes antes e após o tratamento (Figura 1C). Na análise dos valores percentuais de linfócitos OX40+ no agregado plaquetário (AGP), verificou-se elevada expressão (0,4%) em pacientes antes do tratamento quando comparados aos controles (0,2%; $p < 0,0001$; Figura 1D). Na análise dos valores percentuais de OX40+ no AGP em linfócitos (CD41a+) verificou-se elevada expressão nos pacientes após o tratamento (0,29%) quando comparados aos controles (0,2%; $p = 0,0179$; Figura 1D). Não houve diferença significativa nos valores percentuais de linfócitos OX40+ e em linfócitos OX40+ no agregado plaquetário (CD41a+) em pacientes antes e após o tratamento (Figura 1D).

Com relação a expressão de CD40L, não se verificou diferenças significativas na expressão deste receptor nos linfócitos e no agregado plaquetário entre as pacientes antes do tratamento e controles; e antes e após a quimioterapia (Figura 1A e B).

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi realizada a análise da expressão do receptor OX40 e do ligante CD40L em pacientes idosas com câncer de mama antes e 30 dias após primeiro ciclo de tratamento quimioterápico e controles sem histórico pessoal ou familiar de câncer.

Na análise da expressão da molécula CD40L em pacientes idosas com câncer de mama demonstrou não houve diferença significativa dessa molécula entre as pacientes oncológicas e os controles, resultado diferente do encontrado na literatura. Esse perfil de expressão parece estar associado a idade, já que W. Pan et al. (2013) demonstraram níveis elevados de CD40L em linfócitos em mulheres jovens com câncer de mama quando comparado aos controles²². Isso sugere que a imunossenescência pode ser um fator responsável pela baixa expressão de CD40L no câncer de mama em idosas, o que pode estar associado ao melhor prognóstico, pois o câncer de mama em pacientes idosas apresenta uma melhor taxa de resposta patológica completa e de cura²³. Neste contexto, foi observado neste trabalho que não houve aumento de expressão de CD40L no agregado plaquetário, o que significa menor ativação de endotélio (CD40+), impedindo a migração de células tumorais para outros tecidos com auxílio das plaquetas, favorecendo a disseminação do tumor e escape da resposta imune²⁴.

Por outro lado, na análise de OX40 se observou um aumento significativo da sua expressão nos linfócitos nas pacientes idosas com câncer de mama, como também em AGP-linfócitos. Este resultado corrobora com o melhor prognóstico das pacientes idosas com câncer de mama, pois o OX40 é um receptor agonista da resposta imune celular, expresso apenas nas células T quando ativadas e diferenciadas em efetoras¹⁹. O aumento desses receptores denota um elevado número de linfócitos efetores circulantes nestas

pacientes, o que significa que houve uma boa ativação da resposta imune frente aos antígenos tumorais, o que corrobora com uma melhor sobrevida global e livre de doença.

Estudos ao longo da última década demonstraram que os agonistas de OX40 aumentam a imunidade antitumoral em modelos pré-clínicos usando tumores imunogênicos. A terapia com anticorpos monoclonais que ativam os receptores de OX40 mostrou causar regressão tumoral e atraso no crescimento tumoral, principalmente em modelos imunogênicos²⁵. Sendo assim, os resultados deste estudo revelam que o OX40 pode ter potencial como um bom alvo para novas drogas no câncer de mama em idosas.

A quimioterapia atua eliminando as células tumorais por interferir no processo de divisão celular, contudo afeta tanto as células neoplásicas como as normais. Por isso, as doses para pessoas idosas e debilitadas costumam ser menores, inicialmente, até que se determine o grau de toxicidade e de reversibilidade dos sintomas indesejáveis ². Na comparação da expressão do CD40L e do OX40 nos linfócitos das pacientes antes e após o primeiro ciclo de tratamento quimioterápico, não foi encontrada diferença significativa. Contudo, a associação entre a neoplasia da mama e a expressão de OX40 demonstrada neste presente estudo indica que possivelmente, com o decorrer do tratamento e consequente redução tumoral, haverá retorno da expressão dessa molécula aos seus níveis basais.

Durante o decorrer deste estudo, foi verificada a importância do subtipo molecular do câncer de mama para resposta quimioterápica. O subtipo triplo negativo responde melhor à quimioterapia do que outros tipos de câncer de mama, a maioria dos cânceres luminal B apresenta alta sensibilidade à quimioterapia, contudo a quimioterapia proporciona pouco benefício aos pacientes com câncer de mama luminal A^{26, 27, 28}. Para melhor precisão nos resultados, foi realizada outra análise da expressão do OX40 e

CD40L nas pacientes antes e após quimioterapia por subtipos moleculares, no entanto não foi encontrada diferença significativa (dados não mostrados).

A limitação deste estudo é o fato de ser composto por um número pequeno de pacientes e não ter avaliado o perfil de OX40 e CD40L em mulheres jovens com câncer de mama. Para melhor entendimento, faz-se necessária uma análise da expressão de OX40 e CD40L no tecido tumoral, para verificar se existe correlação da expressão dos mesmos no sangue e tecido, pois podem ser possíveis biomarcadores preditivos de prognóstico e de resposta clínica e patológica no câncer de mama em idosas, cuja vantagem é a possibilidade de avaliar através de métodos pouco invasivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Câncer de mama: é preciso falar disso. – 4. ed. – Rio de Janeiro: Inca, 2016.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (Datasus). Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>. Acessado em: 11/12/2016.
3. Anisimov VN. Carcinogenesis and aging 20 years after: escaping horizon. *Mech Ageing Dev* 130(1-2):105-121, 2009.
4. Rodríguez-Rodero S, Fernández-Morera JL, Fernandez AF, Menéndez-Torre E, Fraga MF. Epigenetic regulation of aging. *Discov Med* 10(52):225-233, 2010.
5. Rodríguez-Rodero S, Fernández-Morera JL, Fernandez AF, Menéndez-Torre E, Fraga MF. Epigenetic regulation of aging. *Discov Med* 10(52):225-233, 2010.
6. Fülöp T, Larbi A, Hirokawa K, Mocchegiani E, Lesourds B, Castle S, Wikby A, Franceschi C, Pawelec G. Immunosupportive therapies in aging. *Clin Interv Aging* 2(1):33-54, 2007
7. Mitchell WA, Meng I, Nicholson SA, Aspinall R. Thymic output, ageing and zinc. *Biogerontology* 7(5-6):461-470, 2006.
8. Larbi A, Dupuis G, Khalil A, Douziech N, Fortin C, Fülöp T Jr. Differential role of lipid rafts in the functions of CD4+ and CD8+ human T lymphocytes with aging. *Cell Signal* 18(7):1017-1030, 2006.
9. Pawelec G, Lustgarten J, Ruby C, Gravekamp C. Impact of aging on cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 58(11):1723-1724, 2009.

10. Perdicaris, Antônio André Magoulas; Queiroz, Aristides Cheto de; Oliveira, Djalma de; et al. Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2 ed. rev. atual. - Rio de Janeiro: Pro-Onco. 1993.
11. J. Maher and E. T. Davies. Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Br J Cancer*. 2004 Aug 31; 91(5): 817–821.
12. Alex W. Tong, Maria H. Papayoti, George Netto, Drew T. Armstrong, Guido Ordonez, J. Mark Lawson and Marvin J. Stone. Growth-inhibitory Effects of CD40 Ligand (CD154) and Its Endogenous Expression in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 691–703, March 2001.
13. Tsutomu Kawabe, Miyoko Matsushima, Naozumi Hashimoto, Kazuyoshi Imaizumi and Yoshinori Hasegawa. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya J. Med. Sci.* 73. 69 -78, 2011
14. Caux C1, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*. 1994 Oct 1; 180(4):1263-72.
15. Grewal IS1, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*. 1995 Dec 7; 378(6557):617-20.
16. Fuleihan R1, Ahern D, Geha RS. Expression of the CD40 ligand in T lymphocytes and induction of IgE isotype switching. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995 May-Jun; 107(1-3):43-4.
17. Raul Elgueta,1 Micah J. Benson,1 Victor C. de Vries,1 Anna Wasiuk,1 Yanxia Guo,1 and Randolph J. Noelle1. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 2009 May; 229(1): 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.

18. Aleksandra Korniluk, Halina Kemon, and Violetta Dymicka-Piekarska. Multifunctional CD40L: pro- and anti-neoplastic activity. *Tumour Biol.* 2014 Oct; 35(10): 9447–9457.
19. Michael Croft. Control of Immunity by the TNFR-Related Molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol.* 2010 Mar; 28: 57–78
20. Benjamin Weixler¹, Eleonora Cremonesi², Roberto Sorge³, Manuele Giuseppe Muraro², Tarik Delko¹, Christian A. Nebiker¹, Silvio Däster¹, Valeria Governa², Francesca Amicarella², Savas D. Soysal^{1,2}, Christoph Kettelhack¹, Urs W. von Holzen^{1,4}, Serenella Eppenberger-Castori⁵, Giulio C. Spagnoli², Daniel Oertli¹, Giandomenica Iezzi, Luigi Terracciano, Luigi Tornillo, Giuseppe Sconocchia and Raoul A. Drosler. OX40 expression enhances the prognostic significance of CD8 positive lymphocyte infiltration in colorectal cancer. *Oncotarget*, Vol. 6, No. 35 September 29, 2015
21. Ramstad T, Lawnicki L, Vetto JT, Weinberg AD. Immunohistochemical analysis of primary breast tumors and tumor-draining lymph nodes by means of the T cell costimulatory molecule OX-40. *Am J Surg* 2000; 179: 400–6.
22. Pan W, Gong J, Yang C, et al. Peripheral blood CD40-CD40L expression in human breast cancer. *Ir J Med Sci.* 2013 Dec; 182(4): 719–21
23. Claudia Rolim. Análise retrospectiva de resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante em neoplasia de mama e serviço dos SUS. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, Vol. 9, 2013
24. Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *J Leukoc Biol.* 1998 Mar; 63(3): 373–9

25. Shawn M. Jensen,¹ Levi D. Maston,¹ Michael J. Gough, et al. Signaling through OX40 Enhances Anti-tumor Immunity. *Semin Oncol.* 2010 Oct 1; 37(5): 524–532.
26. Naotaka Uchida, Takako Suda, and Kiyosuke Ishiguro. Effect of Chemotherapy for Luminal A Breast Cancer. *Yonago Acta Med* 2013 Jun; 56(2): 51–56.
27. Zhi-hua Li, Ping-hua Hu, Jian-hong Tu, and Ni-si Yu. Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. *Oncotarget.* 2016 Oct 4; 7(40): 65024–65033.
28. Hanan Ahmed Wahba and Hend Ahmed El-Hadaad. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med.* 2015 Jun; 12(2): 106–116

FIGURAS

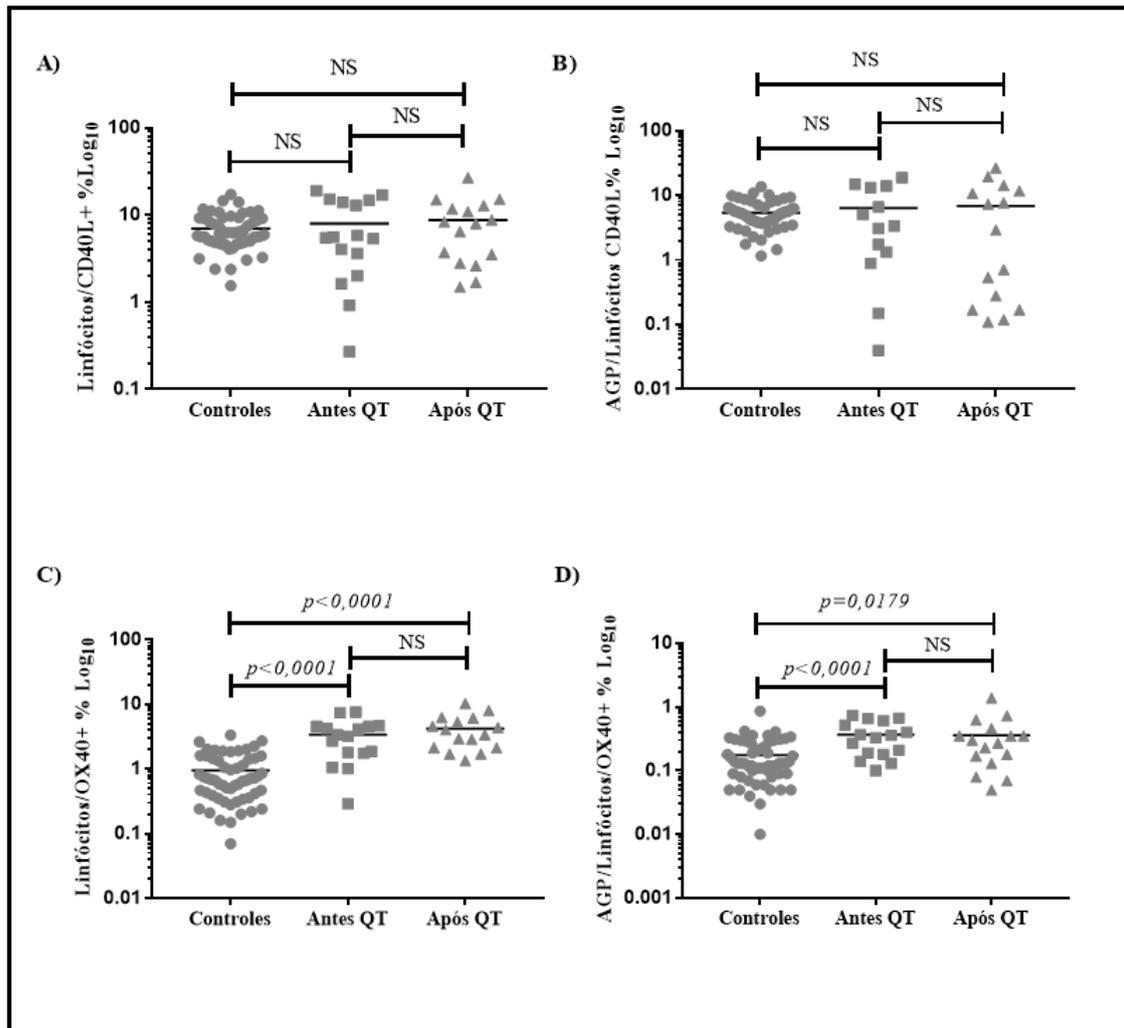


Figura 1- Valores percentuais linfócitos CD40L+ (A), agregado plaquetário (AGP) em linfócitos CD40L+(B), linfócitos OX40+ (C) e AGP em linfócitos OX40+ (D) em controles saudáveis e em pacientes idosos oncológicos antes e após o tratamento quimioterápico. Foi realizado o teste de Mann Whitney para a análise da mediana entre os grupos. Foi considerado significativo $p < 0,05$. NS: não significativo.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

À Dra. Leuridan e Dra. Fátima pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho e por acreditar em mim e em meu trabalho, pois sem sua orientação e incentivo, dificilmente conseguiria chegar aqui. Vocês foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento.

À Dra. Jurema e Dr. Eduardo por seus ensinamentos que me fizeram enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma pesquisa, mas vidas humanas.

À Kleber, Marina e todos os outros colegas de laboratório pelos seus ensinamentos, atenção e apoio.

À Evandro, Marina, Gabriela e Letícia, companheiros de trabalhos e amigos que fazem parte da minha formação. Agradeço muito a vocês não só pela ajuda com este trabalho, mas pela ajuda pessoal, já que sempre se fazem presentes quando preciso.

Ao CNPq pelo incentivo à pesquisa, apoio financeiro e concessão de bolsa.

À todos os pacientes que participaram espontaneamente deste trabalho. Por causa deles que este estudo se concretizou. Vocês merecem meu eterno agradecimento.

Por fim, à todos os outros que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade.