

Análise dos níveis de linfócitos B com expressão de CD80 e CD86 no sangue de mulheres com câncer de mama triplo negativo localmente avançado

Analysis of CD80 and CD86-expressing B lymphocyte levels in the blood of women with locally advanced triple negative breast cancer

Amanda Forte Mendes Tejo Salgado^{1,2,3}; Maria Eduarda Borges Kerstenetzky^{1,2,3}; Vitoria Ferreira David Melquiades^{1,2,3}; Vinícius Rafael Agostinho Gomes Denise Sobral^{1,2,3}; Viana MD, PhD⁴; Marina Cadena da Matta PhD^{1,2}; Marcelo Ramos Tejo Salgado MD, PhD⁴; Leuridan Cavalcante Torres PhD^{1,2}.

¹ Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

² Translational Research Laboratory Prof CA Hart, IMIP, Recife, Brazil

³ Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS), Recife, Brazil

⁴ Hospital de Câncer de Pernambuco, Recife, Brazil

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: Amanda Forte Mendes Tejo Salgado

Telefone pessoal: (81) 991960167

E-mail: amandasalgado2@hotmail.com

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

RESUMO

Objetivo: avaliar os níveis de linfócitos B com expressão de CD80 e CD86 no sangue de mulheres com câncer de mama triplo negativo localmente avançado. **Métodos:** É um estudo de coorte prospectivo e exploratório com 30 mulheres com câncer de mama triplo negativo, e 30 controles saudáveis, realizado no período de 2018-2019. A coleta de sangue periférico foi realizada antes da quimioterapia. Foi realizada a imunofenotipagem de linfócitos B e das moléculas CD80 e CD86 por citometria de fluxo. As mulheres foram avaliadas quanto ao grau de resposta patológica a quimioterapia, sendo distribuídas em grupos com resposta patológica completa (RC) ou parcial (RP). Teste não paramétrico de Mann-Whitney foram utilizados para comparação entre dois grupos. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa Graphpad v7.0. **Resultados:** Foi realizada a análise de 30 pacientes com câncer de mama triplo-negativo localmente avançado. A idade das pacientes variou entre 27 e 59 anos, mediana de idade foi 44,5 anos (35,5-51,7), a maioria das pacientes encontra-se na faixa etária ≤ 50 anos (43,3%). Em relação ao status menopausal, 62,1% estavam na pré-menopausa e 37,9% pós-menopausa. Quanto ao grau nuclear, 63% dos tumores eram de grau 3, seguido de 27% de grau 2. Em relação ao estágio clínico, 30% estavam no estágio IIIA, 63,4% estágio IIIB e 6,6% estágio IIIC. Na avaliação da resposta ao tratamento neoadjuvante 56,7% das pacientes tiveram resposta patológica completa, e 43,3% resposta parcial. As pacientes com CMTN apresentaram níveis elevados de linfócitos B CD86+ quando comparadas aos controles ($p < 0,0001$). Com relação aos níveis de células B totais e B CD80+ não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Na análise dos níveis de células B totais e com expressão de CD86 e CD80, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos RC e RP. **Conclusão:** Este estudo mostrou que o sistema imunológico dos pacientes com câncer de mama triplo negativo é capaz de regular moléculas co-estimuladores em células B circulantes, provavelmente em resposta à doença

Palavras-chave: Neoplasias de Mama; Terapia Neoadjuvante; CD80/86; B7-1/2.

ABSTRACT

Objective: To assess the levels of CD80 and CD86-expressing B lymphocytes in the blood of women with locally advanced triple negative breast cancer. **Methods:** This is a prospective and exploratory cohort study of 30 women with triple negative breast cancer and 30 healthy controls, conducted in 2018-2019. Peripheral blood collection was performed prior to chemotherapy. Immunophenotyping of B lymphocytes and CD80 and CD86 molecules was performed by flow cytometry. Women were evaluated for the degree of pathological response to chemotherapy, and were divided into groups with full (RC) or partial (RP) pathological response. Nonparametric Mann-Whitney test were used for comparison between two groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Analyzes were performed using Graphpad v7.0 software. **Results:** We analyzed 30 patients with locally advanced triple-negative breast cancer. The age of the patients ranged from 27 to 59 years, median age was 44.5 years (35.5-51.7), most patients were in the age group ≤ 50 years (43.3%). Regarding menopausal status, 62.1% were premenopausal and 37.9% postmenopausal. Regarding the nuclear grade, 63% of the tumors were grade 3, followed by 27% grade 2. In relation to the clinical stage, 30% were in stage IIIA, 63.4% stage IIIB and 6.6% stage IIIC. In the evaluation of response to neoadjuvant treatment 56.7% of patients had complete pathological response, and 43.3% partial response. CMTN patients had high levels of CD86 + B lymphocytes when compared to controls ($p < 0.0001$). Regarding total B and CD80 + B levels - no significant differences were observed between the groups. In the analysis of CD86 and CD80 expression and total B cell levels, no significant differences were observed between the RC and RP groups. **Conclusion:** This study showed that the immune system of patients with triple negative breast cancer is able to regulate costimulatory molecules in circulating B cells, probably in response to the disease.

Keywords: Breast Neoplasms; Neoadjuvant Therapy; CD80 / 86; B7-1 / 2.

1 INTRODUÇÃO

O Câncer de Mama é uma doença decorrente da proliferação atípica de células do tecido mamário e se constitui como a neoplasia mais incidente no sexo feminino, excluindo-se o câncer de pele tipo não melanoma, e é o segundo tipo mais comum em todo o mundo^{1,2}. A taxa de incidência dessa neoplasia se mostra levemente superior em regiões subdesenvolvidas quando comparadas à regiões economicamente desenvolvidas e tende a crescer progressivamente a partir dos 40 anos de idade^{1,2}. No Brasil, foram estimados 57.960 novos casos apenas no ano de 2016². Em relação à mortalidade, representa a quinta causa de morte por câncer no mundo e a primeira causa de morte em regiões menos desenvolvidas¹. O estado de Pernambuco, por exemplo, se situa em décimo lugar entre as unidades da federação com maiores taxas de óbito por câncer de mama. A idade se mostra como importante preditor de mortalidade, onde 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 maior².

O CM é uma doença com etiologia multifatorial, além da idade vários fatores de risco foram identificados na gênese dessa doença, assim como: menarca precoce; menopausa tardia; nuliparidade; primeira gestação após os 30 anos; uso de alguns anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal (TRH) na menopausa, especialmente se por tempo prolongado; exposição à radiação ionizante; alcoolismo; dietas hipercalóricas; obesidade; sedentarismo; e predisposição genética pelas mutações em determinados genes transmitidos na herança genética familiar – principalmente por BRCA1 e BRCA2)³. O câncer de mama pode ser classificado de acordo com o padrão de imunohistoquímica e quanto a extensão da doença.

O CM pode ser classificado pelo estadiamento de acordo com a profundidade de invasão (estadio T), com envolvimento linfonodal (estadio N) e a presença de metástase (estadio M). Esses estádios são combinados entre si, formando o estadiamento definitivo. Essa classificação baseada no tumor, nodo e metástase (TNM) é a base para a decisão terapêutica, além de ter valor prognóstico. A grande parte das mulheres diagnosticadas com câncer de mama tem doença localizada, sem metástases. Para essas pacientes a estratégia de tratamento depende do estadiamento baseado no sistema TNM, sendo subcategorizadas como estágio precoce (estágios I, IIA ou IIB, T2N1) e doença localmente avançada (estágio IIB, T3N0, e pacientes com estágios IIIA a IIIC)⁵. A maioria dos pacientes com câncer de mama localmente avançado deve receber tratamento neoadjuvante com objetivo de induzir uma resposta

antitumoral antes da cirurgia e possibilitar a cirurgia conservadora, permitindo, também, uma avaliação precoce da efetividade do tratamento sistêmico ⁶.

Os receptores hormonais do tumor são utilizados, na prática clínica, para classificar o câncer de mama a partir da imuno-histoquímica. Essa classificação é baseada na expressão de receptores hormonais de estrógeno (RE), de receptores hormonais de progesterona (RP), de human epidermal growth fator receptor 2 (HER2) e do índice de proliferação celular Ki67, como mostra a tabela 1.

Com o avanço do conhecimento sobre a biologia dos tumores e a consciencia de que são tecidos complexos, veio à tona a importância de compreender as interações entre o tumor, o microambiente tumoral e as células do sistema imune. Nesse contexto, dois mecanismos que envolvem a resposta imune e o processo neoplásico são fundamentais. Um deles é a capacidade do sistema imunológico promover a destruição de células neoplásicas, o outro é a formação de um processo inflamatório crônico que pode ser capaz de estimular o crescimento tumoral ⁵. Quando um tecido tumoral começa a ser formado, diversos fatores de recrutamento celular são liberados na corrente sanguínea. Alguns deles vão ser capazes de desencadear uma ação antitumoral, enquanto outros vão ser usados a favor das células neoplásicas para escapar da vigilância do sistema imune, favorecendo sua disseminação. Ao passo que células neoplásicas se instalam em um tecido, uma resposta imune celular é iniciada a partir de células dendríticas que se encontram naquele sítio, conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APCs). Elas capturam os antígenos, migram para os linfonodos que drenam aquela região e os apresentam para células T, com isso, ocorre a ativação dos linfócitos TCD4⁺, também chamadas de T auxiliares (T helper - Th), que podem se diferenciar em células efetoras Th1, Th2, Th17 ou células T reguladoras ^{6,7}.

Entretanto, apenas o reconhecimento antigênico não é suficiente para a ativação dos linfócitos T, as APCs devem providenciar sinais adicionais na forma de moléculas coestimuladoras que regulam o grau de ativação dos linfócitos T. As glicoproteínas B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) são moléculas coestimuladoras bem conhecidas ^{7,8}. A molécula CD86 é expressa constitutivamente nas APCs e apresenta níveis aumentados quando as células são ativadas, enquanto a expressão aumentada de CD80 ocorre em períodos mais tardios; indicando que CD86 pode ser mais importante para o início da resposta imune ⁹. O receptor para CD80/86 é o CD28 presente na superfície dos linfócitos T, sendo a ligação de CD28 a CD80 e/ou CD86 potencializa o sinal para a ativação do linfócito T, resultando na ativação, produção e secreção de citocinas (ex. IL-12) e na proliferação destas células contra os

antígenos tumorais ¹⁰.

Atualmente a quimioterapia neoadjuvante (QT NEO) é considerada o tratamento preconizado para pacientes com câncer de mama triplo negativo (CMTN)⁴. Uma resposta favorável depois de realizada a QT NEO pode reduzir significativamente o tamanho do tumor, possibilitando uma cirurgia conservadora em alguns casos⁵. Evidências sugerem que uma resposta patológica completa (RC) depois de realizada a QT NEO está associada com uma maior sobrevida livre de doença e sobrevida geral das pacientes com CMTN⁶⁻⁸. Por outro lado uma resposta patológica parcial (RP) é frequentemente associada a células tumorais resistentes a quimioterapia e levando ao prognóstico esfavorável⁹.

Em relação à imunobiologia do câncer de mama, estudos recentes associaram a presença de infiltrado tumoral de células B a um prognóstico melhor^{11,12}. Não obstante, as células B do sangue periférico foram mal exploradas em câncer de mama triplo negativo. Além disso, os efeitos da terapia QT NEO nas moléculas co-estimuladoras expressas por células B em pacientes com TNBC permanecem desconhecidos. Assim, este estudo objetivou avaliar os níveis de linfócitos B com expressão de CD80 e CD86 no sangue de mulheres com câncer de mama triplo negativo localmente avançado.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo e participantes

Trata-se de um estudo coorte prospectivo e exploratório, foi desenvolvido no período de agosto de 2018 a julho de 2019 nos serviços de Oncologia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e do Hospital de Câncer de Pernambuco. Os testes laboratoriais foram realizados no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP e Hospital de Câncer de Pernambuco sob os números CAAE 39967014.3.3002.5201 e CAAE 39967014.3.0000.5205, respectivamente. Todos os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento livre esclarecido (TCLE).

O estudo compreendeu 30 mulheres com câncer de mama triplo negativo localmente avançado e 30 mulheres saudáveis, ambos os grupos com idade acima de 18 anos. Os critérios de inclusão foram mulheres com idade entre 18 e 60 anos; diagnóstico histológico de carcinoma invasivo de tipo não especial (TNE) ou carcinoma ductal invasivo sem outra

especificação (SOE) ou carcinoma lobular invasivo ou carcinoma misto; sem ter realizado tratamento prévio para câncer. Os critérios de exclusão foram idade inferior a 18 anos ou superior a 60 anos, usuárias de medicamentos imunossupressores, pacientes com história clínica de HIV e HTLV, portadoras ou história familiar de doença autoimune, sinais clínicos de infecção, gestantes, diagnóstico e tratamento prévio para outro tumor, exceto de pele não melanoma, tratamento quimioterápico atual e prévio ao estudo.

2.2 Avaliação da resposta patológica

A inspeção histopatológica de espécimes cirúrgicos determina a resposta patológica após a QT NEO. Nisto, a resposta patológica completa (RC) foi definida como a ausência total de células tumorais na mama e nos gânglios linfáticos axilares. Em contrapartida, a presença de doença residual na mama ou linfonodos axilares no momento da cirurgia foi caracterizada como resposta patológica parcial (RP).

2.3 Citometria de fluxo

Em alíquota de 100 µL de amostra de sangue periférico foi adicionado 5 µL dos seguintes anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos: anti-CD20, anti-CD80 (B7-1) e anti-CD86 (B7-2) (Becton Dickinson-BD, Pharmigen, San Diego, CA). Em seguida, foi adicionado 2 mL de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson, Mountain View, CA) e a amostra foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, protegida da luz. Para lavagem das células, foi utilizado 2 mL de PBS 1X concentrado (pH 7,4), e centrifugado a 300 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Após as lavagens, foi realizada a aquisição no citômetro de fluxo (FACSVerse® - Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Foram adquiridos 30.000 eventos celulares e as análises dos resultados foram realizadas com o programa FACSuite® (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais.

2.4 Análise estatísticas

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi representada em frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central (média/Desvio Padrão ou mediana e interquartil (25-75%). Para as variáveis

quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis quantitativas deste estudo foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). Teste não paramétrico de Mann-Whitney foram utilizados para comparação entre dois grupos. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa Graphpad v7.0.

3 RESULTADOS

3.1 Descrição das características clínicas

Foi realizada a análise de 30 pacientes com câncer de mama triplo-negativo localmente avançado. A idade das pacientes variou entre 27 e 59 anos, mediana de idade foi 44,5 anos (35,5-51,7), a maioria das pacientes encontra-se na faixa etária ≤ 50 anos (43,3%). Em relação ao status menopausal, 62,1% estavam na pré-menopausa e 37,9% pós-menopausa. Quanto ao grau nuclear, 63% dos tumores eram de grau 3, seguido de 27% de grau 2. Em relação ao estágio clínico, 30% estavam no estágio IIIA, 63,4% estágio IIIB e 6,6% estágio IIIC. Na avaliação da resposta ao tratamento neoadjuvante 56,7% das pacientes tiveram resposta patológica completa, e 43,3% resposta parcial. (Tabela 1).

3.2 Análise dos níveis de células B com expressão de CD86/CD80

As pacientes com CMTN apresentaram níveis elevados de linfócitos B CD86+ quando comparadas aos controles ($p < 0,0001$). Com relação aos níveis de células B totais e B CD80+ não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. (Figura 1). Na análise dos níveis de células B totais e com expressão de CD86 e CD80, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos RC e RP (Figura 2).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo propões estudar os níveis de células B e dos co-estimuladores CD80 e CD86 no sangue de mulheres com CMTN. Esses co-estimuladores são fundamentais para ativação dos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígenos (APC). As principais APC são os linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Vários artigos relataram que os tumores

mamários frequentemente impedem a maturação das APCs, a fim de evitar seu reconhecimento pelo sistema imunológico¹³⁻¹⁷.

Nesse sentido, Sathaporn et al. demonstrou que as células dendríticas circulantes de pacientes com câncer de mama apresentam diminuição da expressão de HLA-DR, CD40 e CD86, levando a uma diminuição na capacidade dos APCs de apresentarem o antígeno¹⁸. Assim, a primeira questão abordada pelo presente estudo foi se o próprio câncer é capaz de modular a expressão de CD86/CD80 em células B circulantes. Nossos resultados demonstraram que os pacientes com CMTN apresentam maiores porcentagens de células de CD86 + em relação às mulheres saudáveis, sugerindo que o tumor de mama triplo negativo pode modular a ativação de células B. Em outros tipos tumorais não observados aumento dos níveis de células B CD86 + entre pacientes com câncer e controles saudáveis^{19,20}.

Foi verificado também se as moléculas de CD80 e CD86 são diferencialmente expressas em pacientes com resposta patológica completa e parcial. Os nossos resultados mostraram que não há diferenças significativas entre os grupos de RC e RP. Estudos prévios forneceram evidências de que o status imunológico antes de iniciar a quimioterapia é decisivo para o desfecho clínico. Pesquisadores têm mostrado que os respondedores a QT neo têm maior número de linfócitos circulantes em comparação com não respondedores, indicando que a presença de linfócitos periféricos do sangue antes do tratamento neoadjuvante é benéfica e prevê um desfecho favorável²¹⁻²⁴. No entanto, este estudo não exclui outras possíveis moléculas co-estimuladores a serem associadas a respostas patológicas em pacientes com câncer de mama, como Verma et al. Descobriram que baixos níveis de T reguladoras no sangue periférico está associado com pior prognóstico de câncer de mama.^{25,26}

Nossos dados sugerem que as células B CD86+ nas respostas patológicas do CMTN precisa ser mais explorado, no entanto, o presente estudo apresenta novas percepções sobre os receptores co-estimuladores CD80 e CD86 expressos nas células B circulantes, o que pode ser útil para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos da resposta imune celular e humoral no CMTN.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, esse estudo mostrou que o sistema imune dos pacientes com câncer de mama triplo negativo é capaz de regular moléculas co-estimuladores em células B circulantes, provavelmente em resposta à doença.

REFERENCES

1. 1. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 4429–34.
2. 2. Carvalho FM, Bacchi LM, Pincerato KM, Van de Rijn M, Bacchi CE. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. *BMC Womens Health.* 2014; 14: 102.
3. 3. Estimate/2018 – Cancer Incidence in Brazil. Rio de Janeiro: Instituto QT Neoliberal de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Ministry of Health of Brazil). 2017.
4. 4. Sharma P. Update on the Treatment of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options in Oncol.* 2018; 19.
5. 5. Volders JH, Negenborn VL, Spronk PE, Krekel NMA, Schoonmade LJ, Meijer S, et al. Breast-conserving surgery following neoadjuvant therapy-a systematic review on surgical outcomes. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; 1–12.
6. 6. van der Hage JH, van de Velde CC, Mieog SJ. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;
7. 7. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmüller S, Lebeau A, Kreienberg R, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 3351–7.
8. 8. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet.* 2014; 384: 164–72.
9. 9. Wein L, Loi S. Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (TNBC). *The Breast.* 2017; 34: S27–30.
10. 10. Rubovszky G, Horváth Z. Recent Advances in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2017; 20: 119.
11. 11. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol.* 2014; 32: 2959–66.

12. **12.** Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13: 228–41.
13. **13.** Flynn NJ, Somasundaram R, Arnold KM, Sims-Mourtada J. The Multifaceted Roles of B Cells in Solid Tumors: Emerging Treatment Opportunities. *Target Oncol.* 2017; 12: 139–52.
14. Tsuda B, Miyamoto A, Yokoyama K, Ogiya R, Oshitanai R, Terao M, et al. B-cell populations are expanded in breast cancer patients compared with healthy controls. *Breast Cancer.* 2018; 25: 284–91.
15. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 2836–43.
16. Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP, G II, et al. Decreased Antigen Presentation by Dendritic Cells in Patients with Breast Cancer. Vol. 3. 1997.
17. Pinzon-Charry A, Ho CSK, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C, et al. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br J Cancer.* 2007; 97: 1251–9.
18. Onishi H, Morisaki T, Baba E, Kuga H, Kuroki H, Matsumoto K, et al. Dysfunctional and Short-Lived Subsets in Monocyte-Derived Dendritic Cells from Patients with Advanced Cancer. *Clin Immunol.* 2002; 105: 286–95.
19. Bella SD, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2003; 89: 1463–72.
20. Wolfram RM, Budinsky AC, Brodowicz T, Kubista M, Köstler WJ, Kichler-Lakomy C, et al. Defective antigen presentation resulting from impaired expression of costimulatory molecules in breast cancer. *Int J Cancer.* 2000; 88: 239–44.
21. Amara D, Wolf DM, van 't Veer L, Esserman L, Campbell M, Yau C. Co-expression modules identified from published immune signatures reveal five distinct immune subtypes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; 161: 41–50.
22. Shimabukuro-Vornhagen A, Schlößer HA, Gryschock L, Malcher J, Wennhold K, Garcia-Marquez M, et al. Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer. *Oncotarget.* 2014; 5: 4651–64.

23. Zirakzadeh AA, Marits P, Sherif A, Winqvist O. Multiplex B cell characterization in blood, lymph nodes, and tumors from patients with malignancies. *J Immunol.* 2013; 190: 5847–55.
24. Dou X, Wang R-B, Yan H-J, Jiang S-M, Meng X-J, Zhu K-L, et al. Circulating Lymphocytes as Predictors of Sensitivity to Preoperative Chemoradiotherapy in Rectal Cancer Cases. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2013; 14: 3881–5.
25. Tada N, Kawai K, Tsuno NH, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, et al. Prediction of the preoperative chemoradiotherapy response for rectal cancer by peripheral blood lymphocyte subsets. *World J Surg Oncol.* 2015; 13: 30.
26. Leibowitz-Amit R, Israel A, Gal M, Atenafu EA, Symon Z, Portnoy O, et al. Association between the Absolute Baseline Lymphocyte Count and Response to Neoadjuvant Platinum-based Chemotherapy in Muscle-invasive Bladder Cancer. *Clin Oncol.* 2016; 28: 790–6.

TABELA E FIGURAS

Tabela 1 - Distribuição das frequências absolutas e relativas das características clínicas de 30 mulheres com câncer de mama triplo-negativo localmente avançado.

CARACTERÍSTICAS	N=30	(%)
Idade (anos)		
mediana (IQR)	44,5 (35,5-51,7)	
Idade (anos)		
≤ 50 anos	20	66,6
>50 ≤ 60 anos	10	33,3
Status menopausa		
Pré Menopausa	21	62,1
Pós Menopausa	9	37,9
Grau nuclear		
2	8	27,0
3	22	63,0
Estadiamento		
IIIA	9	30,0
IIIB	19	63,4
IIIC	2	6,6
Resposta patológica completa		
Sim	17	56,7
Não	13	43,3

IQR: Interquartil 25-75.

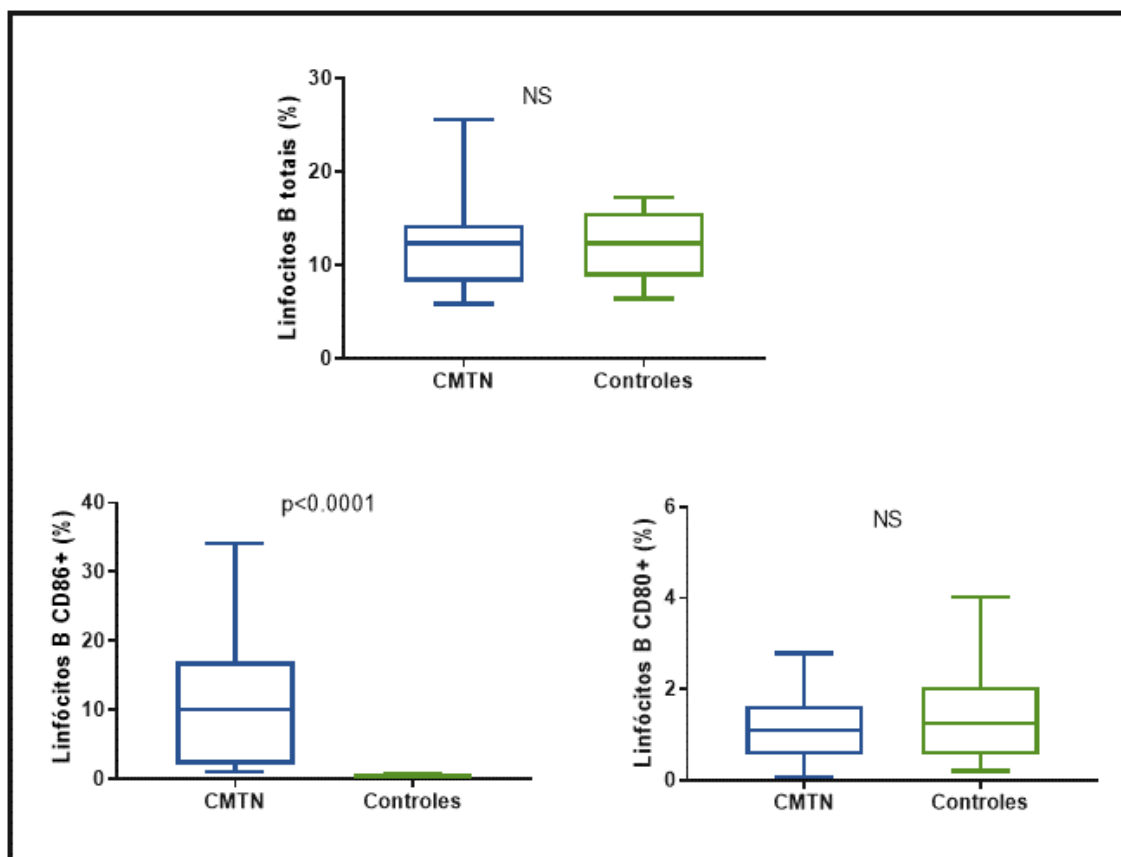


Figura 1: Análise dos níveis de linfócitos B totais e com expressão de CD80 e CD86 na membrana entre os grupos de mulheres com câncer de mama triplo-negativo e controles. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (IQR). Foi realizado o teste de Mann-Whitney. Foi considerado significativo $p < 0,05$. NS: não significativo

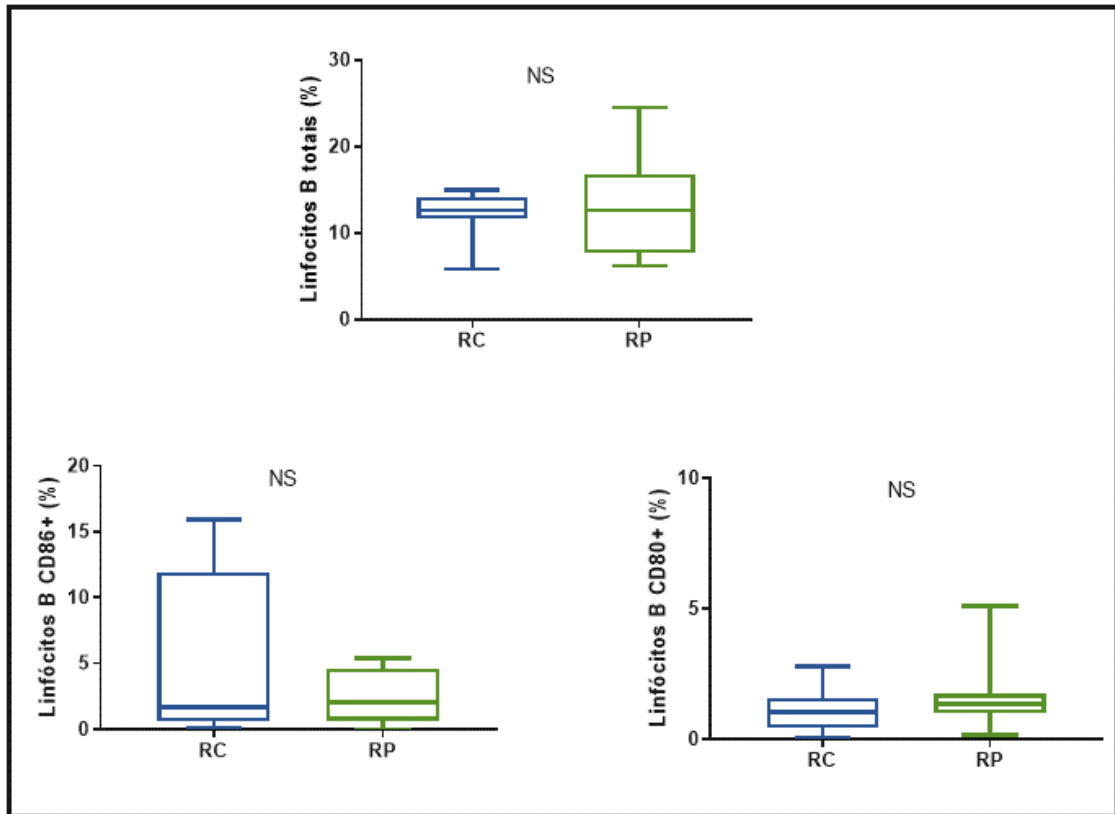


Figura 2: Análise dos níveis de linfócitos B totais e com expressão de CD80 e CD86 na membrana entre os grupos de mulheres com câncer de mama triplo-negativo que obtiveram resposta patológica completa (RC, n=17) e parcial (RP, n= 13). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (IQR). Foi realizado o teste de Mann-Whitney. Foi considerado significativo $p < 0,05$. NS: não significativo