

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE AGREGADOS DE PLAQUETAS-LEUCOCITOS
CIRCULANTES EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

**ANALYSIS OF CIRCULATING PLATELET-LEUKOCYTES AGGREGATES
LEVELS IN WOMEN WITH BREAST CANCER**

Maria Eduarda Borges Kerstenetzky^{1,2,3}; Amanda Forte Mendes Tejo Salgado^{1,2,3};
Vitoria Ferreira David Melquiades^{1,2,3}; Vinícius Rafael Agostinho Gomes^{1,2,3}; Leuridan
Cavalcante Torres PhD^{1,2,4}; Denise Sobral Viana MD, PhD⁴; Eduardo Jorge Abrantes
da Fonte, MD¹; Jurema Telles de Oliveira Lima MD, PhD¹; Marcelo Ramos Tejo
Salgado MD, PhD⁴; Marina Cadena da Matta, PhD^{1,2};

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

² Laboratório de Pesquisa Translacional 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: Maria Eduarda Borges Kerstenetzky

Telefone pessoal: (81) 98188-7680

E-mail: dudaborgesk@gmail.com

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

RESUMO

Objetivo: avaliar dos níveis de agregados de plaquetas-leucócitos circulantes em mulheres com câncer de mama. **Métodos:** entre 2018 e 2019, realizou-se um estudo corte transversal com 27 mulheres com diagnóstico de câncer de mama e idade entre 18 e 60 anos e 15 mulheres saudáveis (controles). Para a avaliação do agregado plaquetário circulante, foram coletadas amostras de sangue periférico no momento da realização dos exames laboratoriais de rotina para diagnóstico e antes do tratamento. A análise do agregado plaquetário foi realizado utilizando anticorpos monoclonais por citometria de fluxo. Testes de Mann-Whitney e Kruskal -Wallis foram usados para análise de medianas entre dois e três grupos, respectivamente. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no graphpad v7.0. **Resultados:** Nas análises dos percentuais do agregados plaquetas-linfócitos (AGP-linfócitos), plaquetas-neutrófilos (AGP-neutrófilos) não foram observadas diferenças significativas entre as pacientes e os controles. No entanto, foi observado que as pacientes apresentaram valores percentuais elevados de agregado plaquetas-monócitos (AGP-monócitos) quando comparado aos controles ($p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis percentuais do AGP-linfócitos e AGP-neutrófilos entre os subtipos luminais A/B, HER2+ e triplo negativo; entre esses subtipos tumorais e controles. Os valores percentuais do AGP-monócitos foram elevados nos subtipos luminais A/B, HER2+ e triplo negativo quando comparado aos controles ($p=0,008$; $p=0,0001$; $p=0,0002$, respectivamente). No entanto, não foram observadas diferenças significativas percentuais do AGP-monócitos entre os subtipos tumorais. **Conclusão:** O presente estudo mostrou o envolvimento do AGP-monócito no câncer de mama triplo negativo e HER2+, sendo esses subtipos tumorais mais agressivos e pior prognóstico. Com base nesses dados ficou clara a importância de novos estudos que tenham como base investigação do papel das interações entre as plaquetas e as células do sistema imune no câncer de mama. As moléculas envolvidas nas ligações entre plaquetas e leucócitos podem ser possíveis alvos terapêuticos.

Palavras chaves: câncer de mama; plaquetas; sistema imune.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the levels of circulating platelet-leukocyte aggregates in women with breast cancer. **Methods:** Between 2018 and 2019, a cross-sectional study was conducted with 27 women diagnosed with breast cancer aged 18 to 60 years and 15 healthy women (controls). For the evaluation of the circulating platelet aggregate, peripheral blood samples were collected at the time of routine diagnostic laboratory tests and prior to treatment. Platelet aggregate analysis was performed using monoclonal antibodies by flow cytometry. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used for analysis of medians between two and three groups, respectively. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Analyzes were performed on graphpad v7.0. **Results:** In the analysis of percentages of platelet-lymphocyte aggregates (AGP-lymphocytes), platelet-neutrophils (AGP-neutrophils), no significant differences were observed between patients and controls. It was observed that patients had high percentages of platelet-monocyte aggregate (AGP-monocytes) when compared to controls ($p < 0.0001$). No significant differences were observed in the percentages of AGP-lymphocytes and AGP-neutrophils between A / B, HER2 + and triple negative light subtypes; between these tumor subtypes and controls. The percentage values of AGP-monocytes were elevated in the A / B, HER2 + and triple negative light subtypes when compared to controls ($p = 0.008$; $p = 0.0001$; $p = 0.0002$, respectively). No significant percentage differences in AGP-monocytes were observed between tumor subtypes. **Conclusion:** The present study showed the involvement of monocyte AGP in triple negative breast cancer and HER2 +, being these tumor subtypes more aggressive and worse prognosis. Based on these data, the importance of further studies based on the role of interactions between platelets and immune system cells in breast cancer has become clear. Molecules involved in platelet-leukocyte binding may be possible therapeutic targets.

Keywords: breast cancer; platelets; immune system

1 INTRODUÇÃO

O câncer de Mama (CM) é o segundo tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres do mundo e do Brasil, principalmente em mulheres acima dos 50 anos, e a primeira causa de morte por câncer em mulheres¹. O CM está associado a diversos fatores de risco, os quais atuam iniciando ou modificando o transcurso neoplásico das células da mama². Dentre esses fatores estão a idade superior a 40 anos, a composição genética que promove a ocorrência familiar, histórico de câncer presente em parentes de primeiro grau, menarca precoce ou tardia e múltiplos fatores ambientais, como terapia de reposição hormonal, exposição à radiação e uso abusivo do álcool².

O CM é uma neoplasia formada por subtipos biológicos reconhecidos³ que se diferenciam de acordo com a expressão de receptores hormonais na superfície tumoral⁴: receptores de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), e *Epithelial Growth Factor Receptor 2* (HER-2)⁴. Dessa forma, a partir da imunohistoquímica, definiu-se a classificação do CM em: I) Luminal A, com fenótipo RE e RP positivo e HER2 negativo, é o subtipo mais comum e apresenta um bom prognóstico; II) Luminal B, apresenta RE positivo, RP e HER2 positivo ou negativo e tem um pior prognóstico quando comparado ao Luminal A; III) subtipo tumoral HER2+ que apresenta superexpressão de HER2 e não expressa RE e RP; e IV) triplo negativo que não apresenta expressão desses receptores e que juntamente com o subtipo HER2 são considerados os de piores prognósticos⁴.

Para alguns subtipos do CM, quimioterapia e hormonioterapia possuem um papel significativo na redução da mortalidade. Para os tumores de mama localmente avançados é necessário realizar quimioterapia neoadjuvante antes do tratamento cirúrgico⁵. Entretanto, nem sempre o tratamento é efetivo. As causas para altas taxas de resistência tumoral incluem, além das diferenças entre pacientes, a heterogeneidade intratumoral⁶, por isso atualmente vem surgindo as imunoterapias, como uma estratégia de tratamento.

As células tumorais utilizam de vários mecanismos para escapar do sistema imune e promover metástase, dentre eles, a interação com plaquetas. As plaquetas são elementos anucleados resultantes do fracionamento de megacariócitos. São consideradas elementos subcelulares, apesar de dividirem características muito importante das células⁷. A função plaquetária mais conhecida é a hemostasia, mas também ela é fundamental no reparo tecidual, comunicação entre células, angiogênese,

integridade vascular e na liberação de moléculas que estão relacionadas com inflamação e imunidade⁸.

A função plaquetária depende de vários receptores expresso na membrana, os quais, são capazes de estabelecer a agregação, ativação, adesão e estabilização⁸. Essas ações, podem ser mediadas pelas células tumorais circulantes no sangue, além da angiogênese e a formação de nichos de células tumorais⁹. Essa ativação acontece através dos produtos tumorais, como exossomos, prostaglandinas E2, fator tecidual e fatores de coagulação¹⁰.

Com a ativação, as plaquetas influenciam a resposta inflamatória no câncer, ativando o endotélio e promovendo o recrutamento dos leucócitos para os locais inflamatórios¹¹. São capazes de promover as interações entre os linfócitos T, e células dendríticas, sugerindo uma comunicação entre as imunidades inata e adaptativa¹².

As plaquetas articulam as respostas inatas e adaptativas, através do envolvimento com leucócitos e possuem papéis cruciais na vigilância imunológica, inflamação e câncer¹³. Após a ativação das plaquetas, ocorre uma grande expressão de moléculas de adesão, responsáveis pela formação do agregado de plaqueta com os leucócitos e as células tumorais^{8,14}. O agregado das plaquetas com os leucócitos representa um marcador de muitas doenças¹³. Esses agregados de plaquetas com as células tumorais facilita a evasão imune e o acesso das células tumorais para outros locais, contribuindo para a disseminação e, conseqüentemente, metástase tumoral¹³.

É comum associar a trombocitose, com a redução da sobrevida em pacientes com câncer¹⁵, somado a isso, a progressão do CM pode ser mediada por componentes do sistema hemostático¹⁶, sugerindo um potencial papel das plaquetas na patogênese da doença¹⁷. Aproximadamente, um terço de todos os pacientes com câncer apresenta trombocitose no momento do diagnóstico, e 40% de todos os pacientes com trombocitose apresentam metástase tumoral¹⁵.

Como as células tumorais utilizam diversos mecanismos para escapar da vigilância imunológica¹⁰, o agregado plaquetário pode também favorecer esse escape do sistema imune¹⁸, estando associado ao pior prognóstico. A relação do agregado plaquetário com a célula tumoral desempenha papel imunossupressivo através dos mediadores que são liberados após sua ativação. Estudos mostram que a P-selectina, molécula de adesão expressa na superfície das plaquetas medeia a metástase tumoral¹⁸. Desse modo, as terapias antiplaquetárias representam uma possibilidade de melhora no desfecho do paciente¹⁹.

Diante do exposto, pode-se observar que o sistema imune age através de diferentes populações celulares e mecanismos de ativação e inibição da resposta celular, promovendo tanto a imunovigilância quanto o escape imune no câncer de mama. Vários estudos têm avaliado o prognóstico e a importância do infiltrado linfocitário tumoral no câncer de mama, utilizando técnicas de imuno-histoquímica. Entretanto, faltam estudos que avaliem os níveis de agregados de plaquetas-leucócitos no sangue periférico, portanto, o objetivo desse trabalho avaliar dos níveis de agregados de plaquetas-leucócitos circulantes em mulheres com câncer de mama.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho e participantes do estudo

Foi realizado um estudo de corte transversal, exploratório e translacional no Serviço de Oncologia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Hospital de câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório Multiusuário de Pesquisa Translacional do IMIP no período de agosto de 2018 a julho de 2019. 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, seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento livre esclarecido (TCLE).

Utilizou-se como critérios de inclusão: mulheres com tumor maligno de mama dos subtipos moleculares luminais, HER2+ e triplo negativo, com diagnóstico histológico de carcinoma invasivo de tipo não especial (TNE) ou carcinoma ductal invasivo sem outra especificação (SOE).

Foram avaliadas 27 pacientes (mediana de 44 anos) com diagnóstico de câncer de mama. As pacientes apresentavam os seguintes subtipos tumorais: 8 com câncer de mama luminais 7 HER2+; e 12 triplo negativo. O grupo controle foi constituído de 15 voluntárias saudáveis com mediana de idade de 48 anos sem história familiar de câncer de mama.

Os critérios de inclusão para as pacientes foram 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 imunossuppressores, pacientes com história clínica de HIV e HTLV, gestantes, diagnóstico e tratamento prévio para outro tumor, exceto de pele não melanoma, tratamento quimioterápico atual e prévio ao estudo.

2.2 Citometria de fluxo

Um volume de 4 mL de sangue foi colhido em tubo com anticoagulante, ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (BD Vacutainer[®]). Numa alíquota de 100 µL de sangue periférico foram adicionados 2 mL de tampão de lise de hemácias (FACS[®] *Lysing Buffer*, Becton Dickinson, Mountain View, CA) e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 2 lavagens consecutivas, adicionando 2 ml de tampão PBS 1x concentrado (pH 7,4) e centrifugando a 400 x g por 5 min a 4°C. Após a segunda lavagem, foi descartado o sobrenadante e as células foram marcadas com 5µL de anticorpo monoclonal anti-CD41a, e em seguida, foram incubados à temperatura ambiente por 20 min e protegido da luz. Após a incubação, foi realizada uma única lavagem adicionando 2mL de tampão PBS 1x concentrado (pH 7,4) e centrifugando a 400 x g por 5 min a 4°C e adquiridas no citômetro de fluxo FACSVERSE[®] (BectonDickinson,Sunnyvale, CA). Foram adquiridos 30.000 eventos celulares na região de linfócitos e as análises dos resultados foram realizadas utilizando o programa FACSuite[®] (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais. Os anticorpos CD41a foram utilizados para marcação de plaquetas. A marcação do agregado de plaquetas-linfócitos, plaquetas-monócitos e plaquetas-neutrófilos foram analisados através da marcação de CD41a na região de linfócitos, monócitos e neutrófilos, respectivamente. As análises foram expressas em percentuais (%).

2.2 Análise Estatística

Na análise descritiva dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição das amostras. As variáveis contínuas com distribuição normal foram

apresentadas em média e desvio-padrão, e as variáveis sem distribuição normal, em mediana e intervalo interquartil (IQR: 25-75).

Nas análises entre grupos foram realizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos, e de Kruskal-Wallis para comparação entre três grupos com correção de Dunn's. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa Graphpad v7.0.

3 RESULTADOS

3.1 Análise do agregado plaquetário (AGP) em linfócitos, monócitos e neutrófilos de pacientes com câncer de mama e controles

Nas análises dos percentuais do agregados plaquetas-linfócitos (AGP-linfócitos), plaquetas-neutrófilos (AGP-neutrófilos) não foram observadas diferenças significativas entre as pacientes e os controles (Figuras 1A e 1B). No entanto, foi observado que as pacientes apresentaram valores percentuais elevados de agregado plaquetas-monócitos (AGP-monócitos) quando comparado aos controles ($p < 0,0001$; Figura 1C).

3.2 Análise do agregado plaquetário (AGP) em linfócitos, monócitos e neutrófilos de acordo com o subtipo tumoral de câncer de mama

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis percentuais do AGP-linfócitos e AGP-neutrófilos entre os subtipos luminais A/B, HER2+ e triplo negativo; entre esses subtipos tumorais e controles (Figuras 2A e 2B).

Os valores percentuais do AGP-monócitos foram elevados nos subtipos luminais A/B, HER2+ e triplo negativo quando comparado aos controles ($p = 0,008$; $p = 0,0001$; $p = 0,0002$, respectivamente). No entanto, não foram observadas diferenças significativas percentuais do AGP-monócitos entre os subtipos tumorais (Figura 2C).

4 DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi avaliado o agregado plaquetário no contexto das neoplasias, contribuindo, assim, no impacto da mortalidade do câncer de mama. As plaquetas são tradicionalmente vistas como fundamentais na trombose e hemostasia²⁰, dessa forma, estudos sobre o envolvimento das plaquetas no sistema imune são recentes e ainda há poucas informações na literatura.

Embora as plaquetas possam exercer algumas de suas funções individualmente, é cada vez mais reconhecido que as interações entre as plaquetas e outros tipos de células circulantes são cruciais para muitas de suas funções²⁰. Qi et al (2015) relataram níveis elevados de agregados de plaquetas em torno de células de diversos tipos de câncer, dentre eles o câncer de mama, da mesma forma que relataram a ausência nos tecidos normais correspondentes²¹. Dessa maneira, isso demonstra como as plaquetas são essenciais para os estágios iniciais do crescimento do tumor, a partir, principalmente, da angiogênese, assim como, a metástase²².

Além disso, tem sido relatado que plaquetas interagem com diversas células do sistema imune, como neutrófilos, linfócitos e monócitos, através de múltiplas interações em condições inflamatórias e infecciosas, além de atuarem no processo de reparo e injúria tecidual²⁰. Nesse estudo, ao comparar os níveis de AGP- linfócitos e AGP-neutrófilos das pacientes com os controles, não houve resultado estatístico significativo. Isso sugere os agregados de plaquetas com linfócitos e neutrófilos não estão envolvidos a resposta imune no câncer de mama.

Nesse estudo, foi observado um aumento do AGP-monócitos nos pacientes com CM quando comparada aos controles. Os AGP-monócitos são marcadores mais sensíveis de ativação plaquetária que a P-selectina²⁴. Dessa forma, sugere que há uma maior ativação do sistema imune nas pacientes com câncer na tentativa de combater as células neoplásicas. Mas também, há uma grande associação do aumento do AGP-monócito com trombose, o que pode contribuir com uma evolução desfavorável do câncer²⁵.

Além disso, observou-se um aumento do AGP-monócitos nas pacientes com tumores de mama triplo negativo e HER2+ quando comparado aos controles. O aumento dos agregados plaquetários sugere um aumento da atividade inflamatória e, conseqüentemente da resposta imune²⁶, isso pode estar associado a esses subtipos serem mais agressivo e de prognóstico desfavorável. Esses pacientes com o câncer de mama

triplo negativo e HER2+ possuem um pior prognóstico quando comparada com os outros subtipos de CM.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou o envolvimento do AGP-monócito no câncer de mama triplo negativo e HER2+, sendo esses subtipos tumorais mais agressivos e pior prognóstico. Com base nesses dados, ficou clara a importância de novos estudos que tenham como base investigação do papel das interações entre as plaquetas e as células do sistema imune no câncer de mama. As moléculas envolvidas nas ligações entre plaquetas e leucócitos podem ser possíveis alvos terapêuticos.

6 REFERÊNCIAS

- 1) Gobbi H, Rocha RM, Nunes CB. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. *J Bras Patol Med Lab.* 2008; 44(2):131-140.
- 2) Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *PrzMenopauzalny.* 2015 Sep; 14(3): 196-202.
- 3) Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006; 295(21): 2492.
- 4) Rodrigues, KS. Polimorfismo rs2736100 do gene hTERT em pacientes com câncer de mama. [Dissertação]. Brasília: Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília; 2017.
- 5) Schorr MC , Pedrini JL, Reginatto GA. Uma nova plataforma terapêutica para o câncer de mama: a evolução do tratamento sistêmico neoadjuvante. 2015. *Rev Bras Mastologia.* 2015; 25(1):20-5.
- 6) Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Updates Surg.* 2017 Sep; 69(3):313-317
- 7) Garraud O, Cognasse F. Are Platelets Cells? And if Yes, are They Immune Cells?. *Frontiers Media SA.* 2015; 6:70.
- 8) Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost.* 2015; 31;114(3):449-58.
- 9) Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV. Antiplatelet agents for cancer treatment: a real perspective or just an echo from the past? *Cancer Metastasis Rev.* 2017 Jun; 36(2):305-329.
- 10) Burkholder B, Huang RY, Burgess R, Luo S, Jones VS et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1845 (2) 182-201.
- 11) Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998; 391(6667): 591–4.10.1038/35393.
- 12) Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009; 229:152–72.
- 13) Finsterbusch M, Schrottmaier WC, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Assinger A.

- Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. 2018; 29(7): 677–685.
- 14) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74
 - 15) Van Es N, Sturk A, Middeldorp S, Nieuwland R. Effects of cancer on platelets. *SeminOncol*. 2014; 41(3): 3118.10.1053.
 - 16) Lal I, Dittus K, Holmes CE. Platelets, coagulation and fibrinolysis in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2013; 15(4):207.
 - 17) Alonso-Escolano D, Strongin AY, Chung AW, Deryugina EI, Radomski MW. Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoproteins. *Br J Pharmacol*. 2004;141:241–52.
 - 18) Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2008; 8(8):1247–55.
 - 19) Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood*. 2015; 126(5):582–588.
 - 20) Lisman T. Platelet–neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. *Cell Tissue Res*. 2018; 371(3): 567-576
 - 21) Qi C, Wei B, Zhou W, Yang Y, Li B, Guo S, et al. P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth. *Oncotarget*. 2015; 6:6584–6596.
 - 22) Johnson KE, Forward JA, Tippy MD, Ceglowski JR, El-Husayni S et al. Tamoxifen Directly Inhibits Platelet Angiogenic Potential and Platelet-Mediated Metastasis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2017;37:664–674.
 - 23) Whiteside TL. Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis?. *Front Oncol*. 2013; 3: 107.
 - 24) Gerrits AJ, Frelinger AL 3rd, Michelson AD. Whole Blood Analysis of Leukocyte-Platelet Aggregates. *Curr Protoc Cytom*. 2016 Oct 10; 78:6.15.1-6.15.10.
 - 25) Harding SA, Sommerfield AJ, Sarma J, et al. Increased CD40 ligand and platelet-monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2004; 176(2):321–325
 - 26) Chen M., Geng J.-G. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch Immunol Ther Exp*. 2006; 54(2): 75–84.

FIGURAS

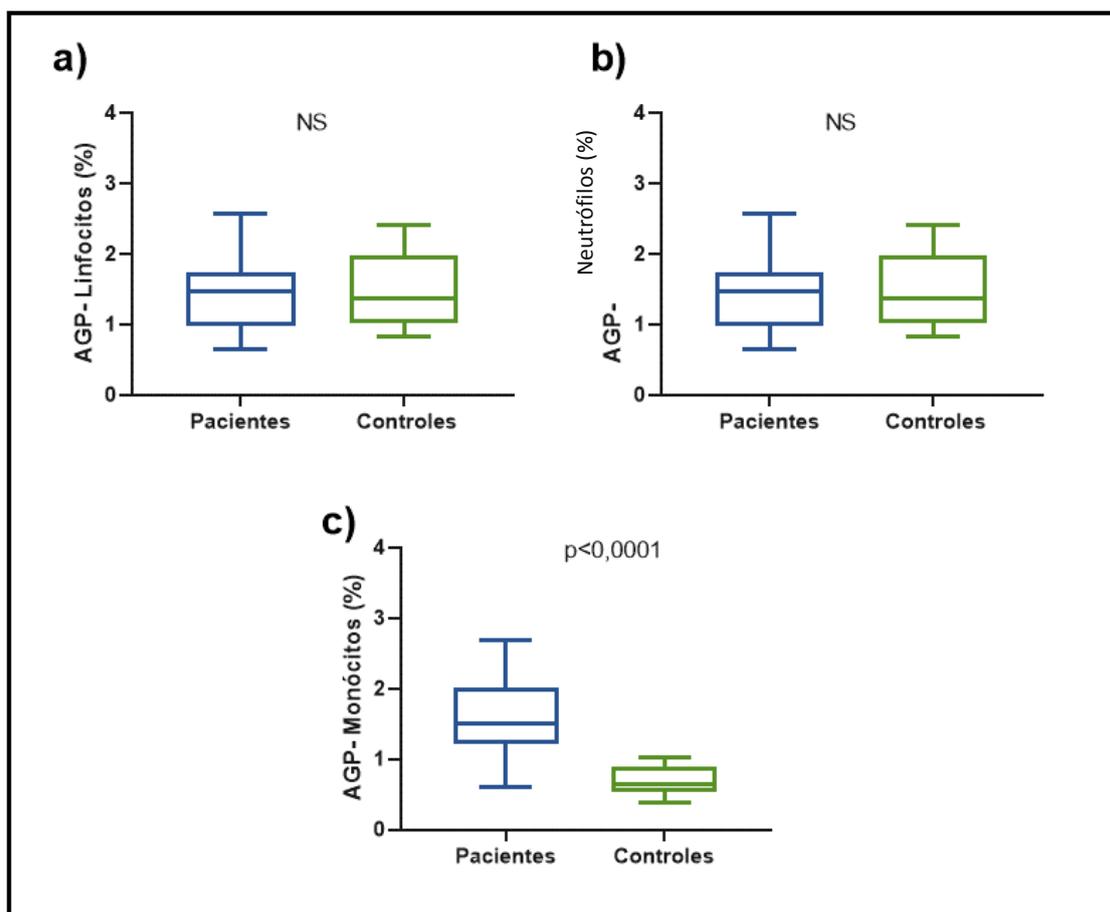


Figura 1. Análise dos valores percentuais do agregado plaquetário (AGP) em: A) linfócitos (AGP-linfócitos), B) neutrófilos (AGP-neutrófilos) e C) monócitos (AGP-monócitos) no sangue periférico dos pacientes com câncer de mama (n=27) e controles (n=15). Os gráficos estão representados em medianas e intervalo interquartil (IQR 25-75%). Foi realizado o teste de Mann Whitney. Foi considerado $p < 0,05$. NS: Não significativo.

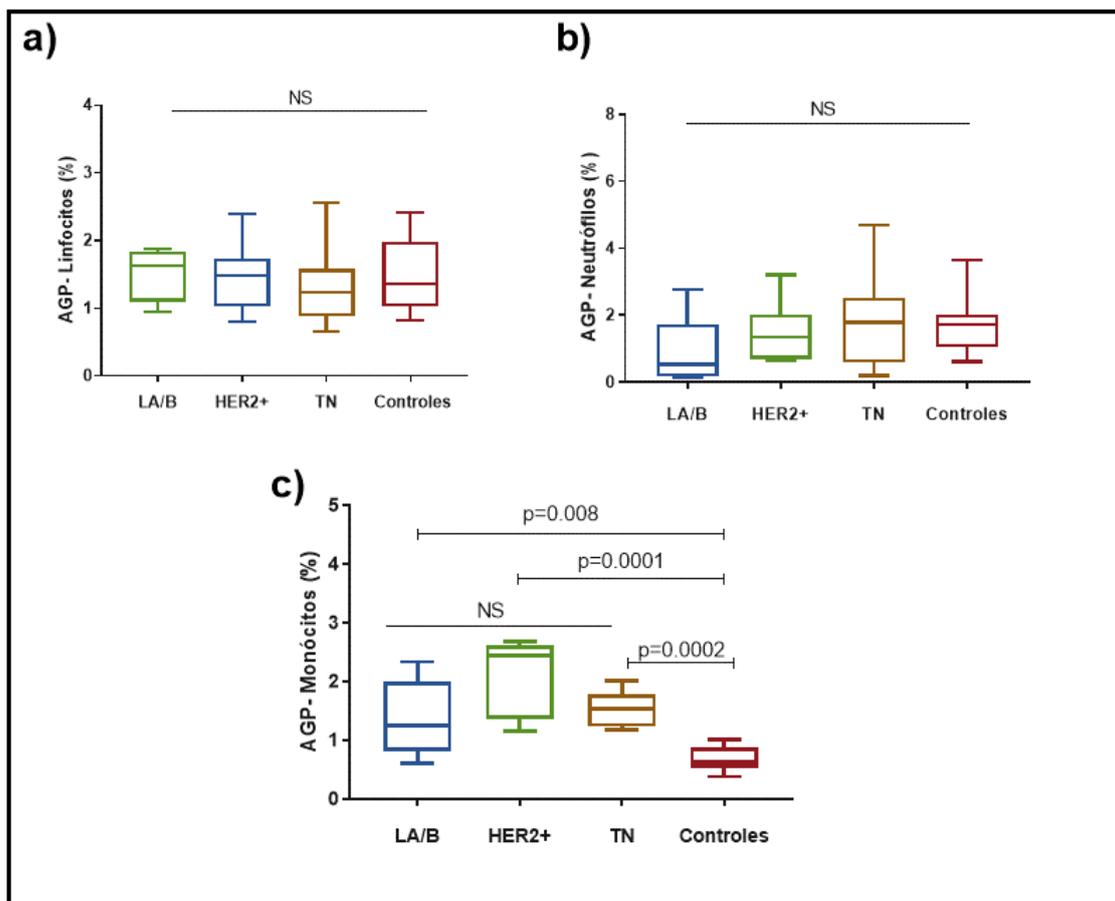


Figura 2. Análise dos valores percentuais do agregado plaquetário (AGP) em: A) linfócitos (AGP-linfócitos), B) neutrófilos (AGP-neutrófilos) e C) monócitos (AGP-monócitos) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama luminal A e B (LA/B; n=8), HER2+ (n=7), triplo negativo (TN; n=12) e controles (n=15). Os gráficos estão representados em medianas e intervalo interquartil (IQR 25-75%). Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado $p < 0,05$. NS: Não significativo.