RODNEY BERZOINI SMITH

Avaliação da eficácia da injeção da vacina de DNA HSP65 do
Mycobacterium leprae em pacientes com estágio avançado
de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, em ensaio
clínico de fase I/II.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica
Orientador : Dr. Pedro Michaluart Júnior

São Paulo
2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Rodney e Elisabeth, pela educação, carinho e amor incondicionais, base impreterível para qualquer realização pessoal e profissional.

À minha esposa Adriana, por todo o auxílio, a dedicação e compreensão que nos torna um só.

À minha filha Catarina, fruto de nosso amor, realização maior de uma vida.

Aos meus irmãos Marco e Fernando pelo apoio e amizade sinceros.

Agradeço a todos os pacientes, verdadeiros motivos da realização deste estudo, pela confiança e esperança.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto R. Ferraz, pelo exemplo, ensinamentos transmitidos, apoio e oportunidades oferecidas.

Ao meu orientador Dr. Pedro Michaluart Júnior, meu mentor, pelo apoio, oportunidades, orientação incansável e amizade verdadeira.

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva, pela oportunidade de aprendizado e crescimento acadêmico.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, pela oportunidade de aprendizado no campo da imunologia.

Ao Dr. Kald Abdalla, pelo auxílio e orientações na elaboração desta tese.

A Dra. Fany Dantas de Lima, pela parceria na elaboração e condução deste estudo.

A Dra. Regina Lúcia Elia Gomes, pela formidável habilidade na avaliação e medição dos volumes tumorais nas tomografias.

A Dra. Maria Cristina Chammas, pelo auxílio imprescindível nas aplicações da vacina.

Ao Prof. Dr. Anói Castro Cordeiro, pelos ensinamentos transmitidos no campo profissional e acadêmico.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Britto e Silva Filho, pelos ensinamentos transmitidos e oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Dr. Lenine Garcia Brandão, pelos ensinamentos transmitidos e oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto Tavares, pelos ensinamentos transmitidos, oportunidades oferecidas, pelas orientações proveitosas quando da aula de qualificação, e pela amizade sincera.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Medina, pela participação fundamental no meu aprendizado cirúrgico.

Ao Prof. Dr. Cláudio Roberto Cernea, pelo exemplo, valiosos ensinamentos transmitidos e oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Dr. Vergilius José Furtado de Araújo Filho, pelos ensinamentos transmitidos e oportunidades oferecidas.

Ao Dr. Roberto Pereira de Magalhães, pelos ensinamentos transmitidos, apoio e pelas oportunas sugestões na elaboração desta tese quando da aula de qualificação.

Ao amigo Dr. Marco Antonio Arap, pelas valiosas sugestões na elaboração desta tese quando da aula de qualificação e pela amizade perene.

Ao amigo Dr. Fábio Luiz de Menezes Montenegro, pelos ensinamentos transmitidos, apoio e pelas importantes sugestões na paciente revisão deste trabalho.

Ao amigo Dr. Sérgio Samir Arap, pelos ensinamentos transmitidos, pelo apoio e incentivo na elaboração desta tese.

A Dra. Eloísa Maria Mello Santiago Gebrim, pelo auxílio na avaliação e realização das tomografias computadorizadas.

Aos assistentes da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HC-FMUSP, Doutores Erivelto Martinho Volpi, Sunao Nishio, Marcelo Dória Durazzo pela importante contribuição no meu aprendizado.

Ao Dr. Carlos Rodrigo Zarate Blades, pelo auxílio, paciência e disponibilidade fundamentais na realização dos testes laboratoriais.

A Fonoaudióloga Lika Arakawa Sugueno, pelo auxílio na avaliação funcional dos pacientes.

A Psicóloga Kariane Peixoto Fernandes, pelo auxílio na avaliação psicológica dos pacientes.

A Dra. Raquel Ajub Moyses, pelo apoio no acompanhamento dos pacientes desta tese.

Aos amigos Dra. Maria Teresa Machado Sodr e Dr. Rgis Turcano, pelo apoio na elaborao desta tese.

Aos meus colegas de residncia Dr. Renato de Castro Capuzzo e Dr. Marcos Roberto Loretto, pela convivncia proveitosa e estimulante.

A Sra. Olinda, pelo auxílio na coleta de material biolgico para este trabalho.

Aos mdicos residentes da Disciplina de Cirurgia de Cabea e Pescoo pelo estimulante convvio dirio.

Aos colegas médicos, enfermeiros, auxiliares da enfermagem de Imunologia do HC FMUSP, pelo auxílio no acompanhamento dos pacientes avaliados nesta tese.

Aos colegas do laboratório de vacinas gênicas da FMUSP de Ribeirão Preto pelo auxílio na realização desta tese.

A Sra. Fátima e Eliane, da pós graduação pelo auxílio prestado durante a pós-graduação.

Ao Colégio Visconde de Porto Seguro e a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela minha formação acadêmica.

A todas as outras pessoas que tenham participado direta e indiretamente na realização de qualquer etapa deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMARY

1. Introdução	1
2. Objetivos	5
3. Revisão de literatura	7
3.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	8
3.2 Fatores de risco	9
3.3 Estadiamento	9
3.4 Tratamento do câncer de cabeça e pescoço	9
3.5 Imunologia do câncer	11
3.6 Vacinas contra o câncer	14
3.7 Utilização do Mycobacterium sp como adjuvante de resposta imune	17
3.8 Proteínas de choque térmico	19

3.9 Utilização da vacina de DNA da HSP65 do <i>M.leprae</i> em câncer	20
3.10 Considerações sobre segurança no uso de uma vacina de DNA	23
4. Casuística e Métodos	26
4.1 Vacina de DNA HSP65 do <i>Mycobacterium leprae</i>	27
4.2 Desenho experimental	34
4.3 Critérios de elegibilidade	34
4.4 Cronograma da aplicação da vacina	36
4.5 Extração de RNA	40
4.6 Análise da integridade dos RNAs extraídos	41
4.7 PCR específica para o gene HSP65	43
5. Resultados	49
6. Discussão	63
7. Conclusões	75
8. Anexos	77
9. Referências bibliográficas	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
Bcg	Bacilo Calmette-Guérin
BSA	Albumina bovina
BCR	Banco de células de referência
BCT	Banco de células de trabalho
CEC	Carcinoma epidermóide
CD	Compact disc
CDNA	DNA complementar
CTCAE	Common toxicity criteria
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNAse	Enzima desoxirribonuclease
DNTP	3'-desoxinucleotídeo trifosfatos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino triacético
et al	e outros
FasL	Molécula pró-apoptótica Fas Ligante
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-macrofágico
HeLa	Human epitheloid cervical carcinoma
HLA	Complexo de histocompatibilidade principal humano
HPV	Papiloma vírus
HSP65	Heat shock protein 65
IFN γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL10	Interleucina 10
LB	Luria Bertani (meio de cultura)
LAL	Limulus Amoebocyte Lysate
Mleprae	Mycobacterium leprae
Mycobacterium sp	Mycobacterium
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro
MOPS	N-morpholino-3-propane sulfonic acid
PBS	Solução de NaCl a 0.9% tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PPD	Purified protein derivative
QSP	Quantidade suficiente para
RECIST	Critério de avaliação de resposta em tumores sólidos
RNAse	Enzima ribonuclease
RTPCR	Retro-Transcrição
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TA	Temperatura ambiente
TAA	Antígenos associados aos tumores
Taq	Thermus aquaticus – (polimerase)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TADA	Trato aéreo digestivo alto
TGFβ	Transforming Growth Factor
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TPO	Anticorpo anti-peroxidase
TG	Tireoglobulina
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TSH	Hormônio tireoestimulante
TIL	Linfócitos infiltrantes de tumor
TNM	Sistema de estadiamento (do inglês Tumor-Nodes-Metastasis)
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
USG	Ultra-sonografia
UICC	União internacional contra o câncer
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
dL	Decilitro
Mm	Milimolar
mm ³	Milimetro cúbico
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
Min	Minutos
Kv	Kilovolt
pH	Potencial de Hidrogênio
UV	Ultravioleta
UI	Unidade internacional
V	Volt
μL	Microlitro
μg	Micrograma

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupo A	54
Tabela 2	Grupo B	57
Tabela 3	Grupo C	60
Tabela 4	Tabela de Sobrevida	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cronograma da aplicação da vacina	36
Figura 2	Paciente participante no protocolo	39
Figura 3	Cálculo do volume tumoral	39
Figura 4	Determinação dos limites da lesão	39
Figura 5	Tomografia e reconstrução de volume pré tratamento	52
Figura 6	Tomografia e reconstrução de volume pós tratamento	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Resultado anatomopatológico	61
Gráfico 2	Gráfico de sobrevida	62

RESUMO

SMITH , R. B. **Avaliação da eficácia da injeção da vacina de DNA HSP65 do *Mycobacterium leprae* em pacientes com estágio avançado de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, em ensaio clínico de fase I/II.** São Paulo, 2006. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Introdução: O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço avançado é uma doença de difícil tratamento. Apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico e tratamento nos últimos 30 anos não ocorreram ganhos significativos em sobrevida. A falha no tratamento ocorre principalmente pela recidiva locorregional e frequentemente impede a realização de tratamentos de resgate. Com o desenvolvimento da imunoterapia novas abordagens tem sido descritas para o combate ao câncer. Estudos em animais demonstraram a redução de tumores com a utilização de vacinas de DNA contendo a HSP-65 do *Mycobacterium leprae*. Neste estudo avaliou-se a utilização desta proteína em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em estágio avançado e fora de possibilidades terapêutica curativa pelos métodos convencionais. **Objetivos:** Testar a viabilidade de realização da injeção intratumoral do DNA HSP65 nesse grupo de doentes, avaliar a resposta tumoral através da análise comparativa do volume, pesquisar a transfecção do DNA HSP65 do *M. Leprae* e verificar se o tratamento realizado apresentou impacto na evolução dos pacientes. **Casuística e métodos:** Foram incluídos 21 pacientes em três grupos. Cada grupo recebeu diferentes doses da vacina de DNA HSP-65 do *Mycobacterium leprae*: 150, 600 e 400µg, através de aplicações intratumorais guiadas por ultra-som com Doppler. Foram realizadas tomografias computadorizadas antes e após o tratamento, para avaliação da resposta tumoral através da comparação de volume tumoral. Realizaram-se biópsias antes e após o tratamento, e o material foi submetido a reação em cadeia da polimerase (Rt-PCR) para identificar a transfecção do DNA injetado. Durante o protocolo os pacientes foram acompanhados para observação de eventos adversos que pudessem ser relacionados à medicação. **Resultados:** Dos 21 pacientes, sete faleceram antes do término do protocolo. Nos 13 pacientes passíveis de análise, ocorreram quatro respostas parciais e estabilidade da lesão em um caso. Em nove casos houve progressão da doença. Dois pacientes encontram-se vivos em seguimento a mais de oitocentos dias do início do protocolo. Os eventos adversos ocorridos foram principalmente aumento da dor local e edema. Não foi possível comprovar a transcrição do DNA injetado no Rt-PCR pela ocorrência de um resultado falso positivo. **Conclusões:** A aplicação foi segura na dose de 400µg por aplicação. Não foi possível comprovar a transfecção de DNA de HSP65. Nos pacientes que apresentaram diminuição do volume tumoral parece ter havido benefício clínico.

SUMMARY

SMITH , R. B. Effectiveness evaluation of the injection of the vaccine of DNA HSP65 of *Mycobacterium leprae* in patients with advanced stage head and neck squamous cell carcinoma in a phase I/II trial. São Paulo, 2006. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Introduction: The squamous cell carcinoma of the head and advanced neck is an disease difficult to treat. Despite the advances in diagnosis and treatment in last the 30 years had not occurred major survival improvements. The treatment failure occurs mainly locoregionally and recurrences frequently cannot be rescued. immunotherapy has had encouraging results in the last years. Studies in animals had demonstrated the reduction of tumors with the DNA vaccine containing HSP-65 of the *Mycobacterium leprae*. In this study we evaluate the use of this protein in patients with advanced head and neck carcinoma, stages II and IV without possibilities of curative treatment. **Objectives:** To test the viability of accomplishment of the intratumoral injection of DNA HSP65 in this group of patients , test its effectiveness through the comparative analysis of the volume, to verify transfection of the DNA injected and to see if the carried through treatment presented impact in the evolution of the patients. **Patients and methods:** 21 patients in 3 groups of doses 150,600 and 400µg of the vaccine of DNA HSP-65 of *M leprae*, through intratumoral applications guided by USG Doppler repeated 3 times every 21 days . CT scans before and after the treatment had been carried through, for evaluation of the tumoral response through the comparison of tumoral volume. We also did biopsy before and after the treatment, and the material was submitted the Rt-PCR in search of transfection of the injected DNA. During the protocol the patients had been evaluated to rule observe adverse events that could be related to the medication. **Results:** Of 21 patients, seven died before the end of the protocol. In the 13 suitable for analysis, 4 partial responses and stability of the disease in 1 case had occurred. In 9 cases the tumors progressed. Two patients are still alive, with more than eight hundred days of the beginning of the protocol. The adverse events occurred mainly as an increase of local pain and edema. It was not possible to prove the transcription of the DNA injected in the Rt-PCR because of the occurrence of positive a false result. **Conclusions:** The application was secure in the dose of 400mcg . We saw reduction of tumoral volume in 5 of the 13 patients suitable for analysis, four partial responses and one stable disease. In the patients who had presented reduction of the tumoral volume there seems to be clinical benefit. It was not possible to prove the transfection of the injected DNA .

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço é um grande desafio à saúde pública mundial. A incidência global de câncer da cavidade oral, laringe e faringe é respectivamente de 390.000, 160.000 e 65.000 casos por ano [1]. No Brasil 4,06% dos óbitos por câncer tiveram origem na cavidade oral e 3,08% na laringe no período entre 1995 e 1999. [2]. Segundo estimativas do INCA, em 2006 serão mais de 13.500 novos casos de câncer de cavidade oral [3].

O carcinoma epidermóide (CEC), responde por 80 a 90% dos casos de câncer de cabeça e pescoço em geral [4, 5], e 95% dos casos localizados especificamente no trato aéreo digestivo alto [6].

Apesar dos avanços nas estratégias terapêuticas e do melhor entendimento da biologia celular e molecular das células cancerosas, nos últimos 30 anos não foram observados avanços na sobrevida dos portadores de CEC do trato aéreo digestivo alto [7]. Até dois terços dos pacientes apresentam-se com tumores avançados no momento de diagnóstico [8], o que além de dificultar o tratamento piora as chances de cura. Entende-se por tumor avançado os estádios III e IV, de acordo com a classificação da União Internacional Contra o Câncer (UICC – quadro 1).

A mais freqüente falha de tratamento é a recidiva locorregional. Em geral o tratamento dessas recidivas é feito com cirurgia, quimioterapia e radioterapia, isoladamente ou associadas e, muitas vezes apresenta riscos e

seqüelas importantes. Frequentemente os pacientes que apresentam recidivas não são candidatos a tratamentos de resgate [9].

Várias novas drogas e estratégias têm sido desenvolvidas na tentativa de melhorar o tratamento desses pacientes. Uma das áreas mais promissoras é a imunoterapia. A possibilidade de potencializar a resposta imune contra o câncer representa uma das grandes esperanças no combate às neoplasias.

A utilização de vacinas de DNA com proteínas de choque térmico demonstrou grande capacidade de gerar resposta imune celular, fundamental no controle de tumores [10, 11]. Após a comprovação de que células tumorais captam e expressam plasmídeos de DNA [12] e de que uma resposta cruzada anti-tumoral pode ser iniciada através da inoculação de DNA desnudo que codifica o HSP 65 do *Mycobacterium leprae* (M leprae) foram realizados testes em animais portadores de tumores sólidos, com comprovada redução dos tumores.

Os pacientes portadores de tumores avançados de cabeça e pescoço refratários ao tratamento, são bons candidatos para a avaliação da utilidade clínica dessa estratégia visto que por vezes não há alternativa terapêutica curativa e, pelas características de apresentação das lesões, são acessíveis a injeção intratumoral. Propõe-se então a realização de ensaio clínico de fase I/II da injeção intratumoral de DNA HSP65 em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, refratários ao tratamento padrão e sem opções de terapia curativa. O presente estudo visa avaliar a eficácia dessa nova estratégia através da comparação clínica e do volume

tumoral antes e depois do tratamento. Também será pesquisada a transfecção e transcrição do DNA HSP65 injetado.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivos responder às seguintes questões nos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço refratário à terapêutica convencional:

1. A injeção intratumoral da vacina de DNA HSP65 é viável?
2. A injeção intra-tumoral da vacina diminui o volume do tumor?
3. Após a injeção, ocorre a transfecção e transcrição do DNA HSP65 do MLeprae?
4. A injeção da vacina de DNA HSP65 do MLeprae modifica a evolução?

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço representa aproximadamente 5% de todos os tipos de câncer, e mais de 900.000 casos novos são diagnosticados anualmente no mundo (o sexto tumor mais freqüente no mundo). Mais de 90% dos tumores de cabeça e pescoço no mundo ocidental, correspondem ao carcinoma epidermóide (>90%) [4].

Nos Estados Unidos da América, as estimativas para o ano de 2005 foram de 29.370 novos casos de câncer de cavidade oral, ocasionando 7.320 óbitos [6].

No Brasil o Ministério da Saúde relatou que 4,06% dos óbitos causados por câncer tiveram origem na cavidade oral e 3,08% na laringe, no período entre 1995 e 1999 [2]. A estimativa oficial é de mais de 13,500 novos casos de câncer de cavidade oral no ano de 2006 [3].

3.2 Fatores de risco

Os fatores de risco mais importantes na gênese do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço são o tabagismo e o etilismo. O álcool atua como potencializador dos efeitos carcinogênicos do tabaco [13, 14].

Alguns tipos de vírus (HPV, EBV) além da irritação crônica das mucosas também são relacionados como fatores envolvidos. Em subgrupos populacionais mundiais alguns hábitos regionais também são importantes na gênese do CEC do trato aéreo digestivo alto como por exemplo: mascar nozes areca, betel , tabaco e ingerir chimarrão [15,16].

A maioria dos casos ocorre em homens a partir da quinta década de vida. No entanto, ultimamente com a difusão do hábito tabágico entre as mulheres, a incidência neste grupo vem aumentando e aproximando-se da incidência entre os homens.

3.3 Estadiamento

O estadiamento do câncer de cabeça e pescoço objetiva separar pacientes em grupos de prognóstico similar.

O sistema TNM, introduzido pela American Joint Comitee on Cancer-AJCC é o mais utilizado para classificar os tumores de cabeça e pescoço. Este sistema baseia-se na extensão do tumor primário, na existência de comprometimento linfonodal e na presença ou não de metástase em outros órgãos [17, anexo 1].

3.4 Tratamento do câncer de cabeça e pescoço

Os mais freqüentes locais de origem do câncer de cabeça e pescoço são: cavidade oral, faringe e laringe. A faringe subdivide-se em nasofaringe,

orofaringe e hipofaringe. Cada uma dessas sub-regiões apresenta características próprias mas, via de regra, pode-se dizer que o tratamento de lesões iniciais, estádios I e II é usualmente cirúrgico ou radioterápico. Os índices de sobrevida em 5 anos giram em torno de 80% para o estágio I e 60% para o estágio II [18].

Já os casos mais avançados, classificados como estágio III e IV requerem tratamento mais complexo, que usualmente consiste na associação de modalidades terapêuticas; cirurgia seguida de radioterapia ou radioterapia combinada com quimioterapia. Dependendo da localização do tumor não existe consenso quanto a qual deve ser o tratamento inicial ideal [19,20,21,22,23]. As particularidades de apresentação de cada caso, a disponibilidade dos métodos de tratamento (quimioterapia, radioterapia, etc.) e a experiência da equipe que vai prestar a assistência são importantes. Os defeitos resultantes da doença e do tratamento, por vezes têm grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, causam alterações anatômicas e fisiológicas importantes, e requerem grandes esforços para a readaptação dos pacientes ao convívio social habitual [18].

O prognóstico dos casos avançados, que representam até dois terços dos pacientes no momento do primeiro diagnóstico [8], é significativamente pior. Os índices de recidiva locorregional chegam a 50% [24,25,26] e metástases à distância estão presentes em até 20% dos casos [25].

Quando ocorre recidiva da doença mais freqüentemente é local ou regional, Kotwall et al. observaram que a maioria dos pacientes que faleceram em decorrência de CEC do TADA apresentavam doença

locorregional e mais de 90% dos portadores de metástases à distância apresentavam doença fora de controle no sítio primário ou no pescoço [27]. O tratamento ideal para as recidivas é a sua ressecção cirúrgica completa [28], porém 50% dos pacientes não são passíveis de tratamento curativo [9]. Para estes pacientes resta a quimioterapia paliativa e em casos selecionados re-irradiação e quimioterapia [29,30,31].

Os índices de resposta são baixos nas recidivas e nas tentativas de palição, variando entre 15 e 30% [32,33]. Quanto à sobrevida dos portadores de doença avançada, em uma população semelhante à nossa amostra, Carvalho et al observaram em pacientes submetidos a cuidados paliativos 15,9% em 1 ano [34]. Kowalski e Carvalho observaram a evolução de 808 pacientes portadores de CEC do TADA, sem tratamento. A média de sobrevida foi de 3.82 meses e 50% dos pacientes faleceram em 4 meses [35].

Estes dados evidenciam a necessidade de novas estratégias para diminuir a possibilidade de recidivas locais e regionais, ou para melhor tratá-las, o que pode levar a um grande impacto na sobrevida de pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço.

3.5 Imunologia do câncer

Cabe ao sistema imune o combate aos tumores, através do reconhecimento e destruição das células neoplásicas. As células tumorais têm instabilidade gênica o que propicia a formação de diferentes subclones e

faz com que o tumor seja composto de células heterogêneas, o que leva a um perfil antigênico diferente.

Como resultado das freqüentes alterações no genoma as células tumorais podem ser diferentes entre si e expressar diversas proteínas ausentes nas células não tumorais [36]. Quando estas diferenças são significativas, estas proteínas são chamadas antígenos associados aos tumores (TAA). As células que expressam TAA reconhecidos pelo sistema imune são destruídas.

As células ignoradas pelo sistema imune vivem e proliferam, caracterizando um processo conhecido como sobrevivência e seleção positiva pelo sistema imune. Esta teoria de sobrevivência ao sistema imune foi descrita por Burnet em 1956 [37]. O tumor é considerado capaz não só de escapar como também de desorganizar a resposta imune do hospedeiro [38].

A relação entre o sistema imune e o tumor não é unidirecional e sim bidirecional, com contribuição do hospedeiro e do tumor. As células tumorais podem escapar passivamente do sistema imune não sendo reconhecidas por deficiências do próprio sistema imune bem como podem secretar substâncias imunomoduladoras e ativamente iludir o sistema imune. Portanto, a presença de antígenos tumorais pode não ser suficiente para estimular a resposta imune do hospedeiro [39].

Dentro da resposta inata destacam-se os macrófagos e células natural killer (NK). Já foi demonstrado que os macrófagos presentes nos tumores são reprogramados, perdem sua função de célula apresentadora de antígenos e inibem o funcionamento dos linfócitos através da liberação de

IL10, prostaglandinas e radicais livres de O_2 facilitando a progressão tumoral [40].

As células NK levam a lise e morte celular através do reconhecimento de células tumorais que não expressam o complexo de histocompatibilidade maior (MHC), através da liberação de perforinas. Porém existem células tumorais comprovadamente resistentes às perforinas. Outro aspecto importante foi a determinação que as células NK raramente estão entre os linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) e, geralmente aparecem somente em lesões pré-malignas e iniciais [41].

Entre os efetores da resposta adaptativa destacam-se os linfócitos B e T. Atualmente, considera-se como objetivo final da maioria das imunizações contra o câncer a geração de linfócitos T antígeno-específicos. Nesse contexto as células dendríticas ou células apresentadoras de antígenos têm posição central. Elas devem capturar antígenos tumorais e apresentá-los aos linfócitos T CD4+ ou CD8+ junto com as moléculas do MHC classes I e II, gerando uma resposta citotóxica anti-tumoral efetiva. Para ocorrer ativação das células dendríticas são necessárias citocinas pró-inflamatórias como IL2, $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$ a fim de suprimir a tolerância aos antígenos tumorais que são reconhecidos como próprios. Entretanto no microambiente tumoral predominam citocinas como IL10 e $TGF\beta$ que predispõe à tolerância imunológica.

Os linfócitos B produzem anticorpos específicos contra antígenos tumorais, mas eles não são muito freqüentes entre os linfócitos TIL. Alguns tumores também expressam em maior quantidade FasL fator indutor de

apoptose de linfócitos. Por todos estes motivos supracitados alguns autores denominam a área tumoral de sítio de imunoprivilégio [42].

3.6 Vacinas contra o câncer

As vacinas gênicas podem ser profiláticas ou terapêuticas. O objetivo de vacinas terapêuticas é gerar uma resposta imune potente e sustentada contra o tumor através do reconhecimento de epítomos tumorais pelo sistema imune. Uma diferença importante entre os microorganismos patológicos e os tumores, como alvos potenciais de vacina é que as células tumorais derivam de células do hospedeiro e grande parte das suas macromoléculas estão presentes nas células normais como antígenos próprios do organismo, e portanto não deflagram resposta imune. A dificuldade aumenta porque muitos dos antígenos tumorais não são expressos na superfície da célula tumoral. Para contornar esta falta de reconhecimento do tumor pelo sistema imune, antígenos específicos que levem a identificação da célula tumoral pelo sistema imune devem ser utilizados. [43].

Para o tratamento de tumores sólidos, as alternativas de terapia gênica atuais podem ser divididas em três grupos: 1- restauração de genes supressores de tumor, 2- inserção de genes que levem à produção de substâncias citotóxicas no câncer e 3- modulação do sistema imune para reconhecimento e destruição da neoplasia.

Essas formas de terapia gênica mencionadas já tem sido testadas em fases pré-clínica e clínica. Entre as estratégias que pertencem ao grupo 1 e 2 podemos citar:

Cohen et al [44] transferiram DNA de adenocarcinoma de mama e melanoma em uma linhagem de fibroblastos de camundongos. Os camundongos que foram imunizados com estes fibroblastos apresentaram potente reação antitumoral, levando inclusive à regressão de pequenos tumores já estabelecidos.

Tolcher et al [45] utilizaram um adenovírus como vetor para administração sistêmica do gene de p53 selvagem, em pacientes com CEC do TADA. Observaram alterações na coagulação dos pacientes e sintomas como náuseas, fadiga e febre, mas comprovaram a expressão do gene administrado no tumor alvo.

A tentativa de promover o reconhecimento do tumor e estimular a resposta imune foi uma estratégia avaliada em outros estudos, que podem ser classificados como do grupo 3:

Houve tentativa através da utilização de células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos e potentes estimuladoras de linfócitos T. A comprovação de que as células dendríticas têm a função diminuída em tumores por Gabrilovich et al [46] resultou na tentativa de alguns autores de utilizar células dendríticas estimuladas ex-vivo como vacinas anti-tumor. Lee et al conseguiram a diminuição do número de metástases pulmonares de melanoma em camundongos com a utilização de células dendríticas

submetidas a eletrofusão com células tumorais [47]. Também têm sido utilizadas outras técnicas de estímulo das células dendríticas como fusão com células tumorais irradiadas [48] pulso com células neoplásicas [49] e com proteínas do tumor [50], levando à proteção posterior a desafios tumorais subseqüentes.

Outro modo de estimulação foi através da injeção de DNA, administrado na forma de um plasmídeo. Quando intracelular pode levar à produção de RNA mensageiro e conseqüentemente à síntese de proteínas. Pode-se inocular diretamente DNA desnudo mas, na tentativa de aumentar o índice de transfecção, pode-se utilizar vetores, os mais freqüentes são os adenovírus e os retrovírus [51].

Pode-se utilizar células do tumor modificadas, que são a maior e mais variada fonte de antígenos da neoplasia, como realizado por Couch et al [52], com a demonstração que uma vacina tumoral de células de CEC, manipuladas para secretar GM-CSF induziu proteção contra o desenvolvimento de CEC de cavidade oral em ratos. Wyatt et al [53] injetaram células tumorais atenuadas com radioterapia e estimuladas com GM-CSF na coxa de portadores de CEC do TADA. Após a dissecação de linfonodos inguinais foi confeccionada uma cultura de células T, posteriormente aplicadas sistemicamente nos mesmos pacientes. Foi comprovada baixa toxicidade.

Pode-se ainda promover a produção de citocinas, como feito por Gleich et al, ao introduzir genes visando a produção de HLA-B7 e microglobulina $\beta 2$ e a conseqüente expressão de MHC I em pacientes portadores de CEC de

cabeça e pescoço, considerados fora de possibilidades terapêuticas curativas, levando a resposta parcial e estabilidade de doença em 30% dos pacientes [51].

A utilização de vacinas de DNA com a expressão do antígeno HSP 65 levou à proteção contra *Mycoplasma pulmonis* [54] e contra tuberculose [55,56]. Lowrie et al demonstraram a eficácia da aplicação de uma vacina de DNA intramuscular na proteção contra tuberculose [10].

Vacinas contendo peptídeos tumorais para reconhecimento do sistema imune visam à expressão de MHC e estimulação de linfócitos T. Através da mudança de seqüências de aminoácidos dos epítomos (epitope enhancing) a eficácia na estimulação imunológica das vacinas de peptídeos é multiplicada. Este modelo foi testado por Rosemberg, em pacientes portadores de melanoma. Um peptídeo conhecido como g209-2m (epitope enhanced) associado a IL-2 levou a resposta em 42% dos pacientes [57].

3.7 Utilização do *Mycobacterium* sp como adjuvante de uma resposta imune

Geluk *et al.* [58] identificaram seqüências comuns entre o MHC classe 2 de diversos primatas e o *Homo Sapiens* e demonstraram que segmentos importantes para a ligação com o peptídeo de algumas moléculas de HLA-DR permaneceram inalterados por cerca de 30 milhões de anos. Essas moléculas se ligam a peptídeos derivados do *M. Tuberculosis* e *Leprae*, inclusive peptídeos derivados da HSP65 do *M. Leprae*, demonstrando que

esta proteína é um epítopo importante e pode ter tido um papel na pressão evolutiva do MHC dos primatas. Um grande corpo de evidências sugere que as infecções, tais como lepra e tuberculose, vêm esculpindo o sistema imune no decorrer de milhões de anos. Este dado é reforçado pelo fato de que populações isoladas da tuberculose, como, por exemplo, os índios lanomamis da selva amazônica, são especialmente sensíveis a esta infecção e respondem mal mesmo quando previamente vacinados [59]. A presença de uma alta frequência de linfócitos reagindo contra antígenos do *Mycobacterium sp* e de uma estrutura de apresentação de antígenos preparada para tal é explorada dentro da imunologia com a utilização destes antígenos como adjuvantes em imunizações.

Antígenos derivados do *Mycobacterium sp* vêm sendo utilizados há muitos anos como adjuvantes na indução da resposta imune, principalmente celular. Para ilustrar este mecanismo pode-se citar o fato de que a imunização com antígenos derivados do colágeno ou da mielina somente causam artrite ou encefalite auto-imune quando misturados com antígenos do *M. tuberculosis*. O BCG (*Mycobacterium bovis*) também é utilizado clinicamente e com sucesso no tratamento do câncer de bexiga precoce. O uso intravesical de BCG já é prática consagrada no tratamento do câncer nesta localização [60]. Os exemplos de como os antígenos do *Mycobacterium sp* podem ser utilizados como adjuvantes da resposta imune são inúmeros e este conceito é bem estabelecido dentro da imunologia [61].

3.8 Proteínas de choque térmico

Descobertas em 1962 por Ritossa [62], as proteínas do choque térmico são responsáveis pela resposta ao estresse celular metabólico e ambiental. Estão entre as proteínas mais conservadas, sendo presentes desde organismos unicelulares até humanos [63,64,65]. O estresse oxidativo, exposição a metais pesados, inflamação e lesão tecidual, isquemia e reperfusão estão associados a expressão de proteínas de choque térmico (HSP). Através da interação com diversos substratos protéicos, as chaperonas moleculares são uma classe de proteínas que auxiliam na conformação tridimensional da estrutura de proteínas recém-formadas, e com isto impedem a formação de proteínas com conformação tridimensional inadequada prevenindo a desnaturação protéica. Após o estresse as proteínas de choque térmico reparam as proteínas mal-formadas ou promovem a sua degradação [66, 67, 68,69].

A identificação de HSP na membrana celular de células malignas além da comprovação que as HSPs são antígenos freqüentemente reconhecidos pelo sistema imune favorecem o seu uso nas estratégias de imunoterapia do câncer [70]. As HSP servem como carreadores de antígenos e induzem respostas antígeno específicas em linfócitos T e B [71, 72]. As propriedades imuno-estimulatórias das HSPs podem ser divididas em: estímulo da produção de citocinas que atraem células imunes, ativação direta de células dendríticas e apresentação de peptídeos [73].

3.9 Utilização da vacina de DNA da HSP65 do *M.leprae* em câncer

Dados recentes demonstram que a resposta anti-tumoral depende muito do linfócito CD4+ [74] e a célula apresentadora de antígenos desempenha um papel fundamental na sensibilização do linfócito T selvagem (*naive*), sendo a célula dendrítica a única célula descrita que tem a capacidade de sensibilizar linfócitos selvagens [75,76,77].

A vacinação com DNA protege camundongos contra desafios infecciosos como tuberculose e estabelece resposta imune celular antígeno específica que é tanto citotóxica quanto produtora de IFN-gama representada pelos linfócitos T CD4+ e CD8+. Este padrão é considerado o ideal na indução de uma resposta anti-tumoral efetiva [74, 78]. A eficácia da vacina de DNA no tratamento da tuberculose foi tão grande que pela primeira vez se demonstrou que uma vacina de tuberculose possuía atividade coadjuvante terapêutica efetiva [79]. Há ainda evidências que a interação dentro de agrupamentos de células é importante na definição e no comprometimento final de uma célula T selvagem em Th1 ou Th2 [80]. A apresentação de antígenos ocorre em pequenos grupos (*clusters*) de células, e é possível imaginar que a apresentação de antígenos derivados do *Mycobacterium sp* apresentados pela mesma célula dendrítica (ou por uma no mesmo agrupamento) pode contaminar o tipo de resposta a outros antígenos apresentados localmente, principalmente se houver um grande número de células dendríticas infiltrando o local e estas estiverem devidamente ativadas e produzindo IL-12.

O mecanismo pelo qual a vacina de DNA induz uma resposta imune é pouco claro, porém estudos mais recentes demonstram que a ativação e a transfecção das células dendríticas é um evento fundamental na indução da resposta imune [81]. A indução de uma resposta imune celular citotóxica (CD8+) também foi claramente demonstrada com esta vacina [79,10].

Parte importante do efeito adjuvante das vacinas de DNA deve-se ao seu conteúdo de seqüências CpG não-metiladas que induzem a secreção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos locais. Esta citocina promove a aquisição de um fenótipo tipo 1 (Th1) e citotoxicidade durante a apresentação e maturação dos linfócitos T adjacentes, independentemente da sua especificidade. [79,10].

Lukacs et al. [82,83] demonstraram que a inserção *ex vivo* do gene da HSP65 do *M.leprae* em linhagens de células tumorais resultou na incapacidade destas células de formar tumores em camundongos imunocompetentes. Este grupo também descreve que a transfecção do mesmo gene *in vivo* causou a regressão de tumores altamente agressivos de modelos experimentais. Este fato ocorreu em camundongos imunocompetentes e não em camundongos com imunodeficiência combinada grave, sugerindo que a presença de células T mediaram a resposta anti-tumoral e erradicaram o tumor [83]. Tais dados sugerem que a utilização de HSP65 do *M.leprae* pode ser uma nova abordagem no tratamento de tumores estabelecidos.

Lukacs et al. também demonstraram que a utilização de uma linhagem de células tumorais - sarcoma J774 - transfectada com o gene do HSP65 do

M. leprae (Cell line J774-HSP65) também induziu proteção contra o crescimento de tumores da linhagem original que não expressava o gene HSP65 (Cell line J774). Esta reatividade cruzada demonstra que a resposta imune contra o tumor não se dirige exclusivamente a epitopes da HSP65 e esta resposta se “espalha” a outros antígenos, indicando que a HSP65 predispõe a quebra da tolerância imunológica aos antígenos tumorais, fornecendo a explicação de uma indução de resposta cruzada na transfecção de um tumor com antígenos do *M.leprae* [82]. Por este motivo a terapia com HSP65 não requer grande nível de expressão gênica pois relativamente poucas células tumorais transfectadas são capazes de induzir resposta imune eficaz, o que constitui uma grande vantagem considerando-se as limitações impostas pela alta tecnologia e custo da terapia gênica atualmente. Além disso, o mesmo grupo demonstrou in vitro que linfócitos T derivados de camundongos vacinados com a linhagem singênica J774-HSP65 eram citotóxicos para células da linhagem original J774, confirmando que a resposta citotóxica não se dirigia exclusivamente ao antígeno HSP65 e que esta resposta se dirigia também a antígenos tumorais [83]. Pode contribuir para essa característica o fato da HSP65 funcionar como chaperona aumentando a antigenicidade de proteínas tumorais estranhas, por facilitar sua apresentação aos linfócitos T , que são capazes de eliminar células tumorais transfectadas [84].

Estes dados experimentais demonstram que a transfecção do HSP65 do *M.leprae* induz uma resposta anti-tumoral cruzada e que esta propriedade

desta vacina pode ser utilizada para novas abordagens no tratamento de tumores em seres humanos.

3.10 Considerações sobre segurança no uso de uma vacina de DNA.

O risco de indução ou aceleração de uma doença auto-imune com o uso de uma vacina de DNA foi estudado extensamente em modelos murinos. Nos experimentos com camundongos houve detecção de um aumento do título de anticorpos anti-DNA que não foi acompanhado de nenhum sinal de doença auto-imune sistêmica como revisto em White et al [60]. Estudos clínicos de Fase I em humanos observaram atentamente o surgimento de qualquer sinal de auto-imunidade ou de anticorpos anti-DNA e nenhum destes foi detectado [85]. Diversos ensaios clínicos com vacinas de DNA já estão em andamento no momento, entre estes incluem-se as vacinas para-AIDS, hepatite B, herpes, influenza, malária, câncer de cólon, linfoma, melanoma, etc [www.clinicaltrials.gov; 61]. As vacinas de DNA têm sido associadas a reações típicas do uso de vacinas (febre, linfomegalia, reação local, etc), porém não houve relatos de reações graves com risco de vida para o indivíduo [85]. Outro ponto importante é que síndromes auto-imunes demoram anos para se desenvolverem e a sobrevivência dos pacientes com câncer avançado possivelmente não permitira observar tal acontecimento.

A vacina de DNA pode teoricamente induzir a uma mutação e ser oncogênica. Entretanto, este risco teórico não foi demonstrado em nenhum modelo experimental [85]. Além disso, a utilização generalizada de vacinas

contendo vírus de DNA replicantes (Varíola) não foi associada a oncogênese e possui teoricamente risco similar a uma vacina de DNA [61; 85].

A HSP65 é uma proteína da família das HSP60 gerada em condições de estresse oxidativo, conserva grande homologia entre as diferentes espécies e apresenta potente ação imunogênica. Uma das principais pesquisadoras desta área, Lukacs et al, não observou a ocorrência de sinais de auto-imunidade em nenhum animal acompanhado nos seus estudos de sobrevivência em longo prazo e já foi observada a utilização da HSP65 para prevenir artrite reumatóide [84].

Estudos em Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) em pacientes e em animais com LES experimental demonstraram que apesar da formação de resposta imune com a produção de anticorpos contra antígenos HSP 65 e 70, não ocorreu correlação clínica entre os títulos dos anticorpos e atividade de doença. Assim supõe-se que estes anticorpos não participam da resposta imune [86]. Outros autores conseguiram proteger ratos contra artrite reumatóide com a utilização de aplicações de DNA desnudo de HSP65 do *M.leprae* [87,88].

A proteína recombinante HSP65 do *M.leprae* é um antígeno importante e induz uma resposta celular e humoral em pacientes com hanseníase e em contactantes saudáveis destes pacientes, o que sugere que a reatividade cruzada entre esta proteína e outras proteínas humanas é improvável, pois não houve nenhuma descrição de eventos auto-imunes nestes pacientes [89]. Teoricamente a apresentação de tal proteína através de uma vacina de DNA não necessariamente é a mesma de uma infecção natural, pode induzir

uma resposta auto-imune mesmo que a infecção natural não a induza e pode ser muito mais imunogênica.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Vacina de DNA HSP65 do *Mycobacterium leprae*

Método de definição da qualidade dos lotes da vacina para os ensaios clínicos da vacina de DNA-HSP65.

Avaliação microbiológica e de contaminantes.

A avaliação da vacina quanto a presença de fungos, vírus, bactérias e pirógenos foi realizada no Laboratório de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto sob a responsabilidade do Farmacêutico José Maciel Rodrigues Júnior de acordo com critérios da atual legislação. O método a ser empregado na definição da segurança do uso clínico será o correntemente utilizado na formulação de materiais biológicos.

Protocolo de produção e controle de qualidade de DNA plasmidial para estudo clínico.

A estratégia para purificação de plasmídeo em larga escala é possível de acordo com a seguinte metodologia:

a. Estabelecimento de um Banco de Células de Referência (BCR) visando assegurar a identidade e pureza do material de partida do lote de DNA a ser obtido: O BCR foi montado a partir de uma única colônia de bactéria após caracterização pelos testes descritos no item g. Para tal, *E. coli* DH5 transformada com o plasmídeo de interesse será cultivada a 37° C em

meio LB agar contendo antibiótico como marcador de seleção. Uma das colônias desenvolvidas será removida da placa e expandida em meio LB líquido contendo antibiótico. Esta cultura será dividida em diversas alíquotas que serão crio-armazenadas a -80°C ou em nitrogênio líquido dando origem ao BCR.

b. Estabelecimento de um Banco de Células de Trabalho (BCT): O BCT foi obtido pela expansão, em meio LB líquido contendo antibiótico, de uma alíquota de células oriundas do BCR. A cultura obtida será dividida em alíquotas, crio-armazenadas a -70°C ou em nitrogênio líquido, e utilizadas para iniciar a produção dos lotes de plasmídeos.

c. Estabelecimento do protocolo de fermentação a fim de otimizar os critérios de qualidade e rendimento em larga escala: Foi preparado um pré-inóculo onde uma alíquota do BCT será rapidamente descongelada a 37°C e assepticamente inoculada em meio LB contendo antibiótico. Esta amostra será incubada a 37°C sob agitação. Durante o meio da fase exponencial de crescimento, uma alíquota desta cultura inicial foi retirada e diluída em meio LB contendo antibiótico. Como na etapa anterior, o procedimento de crescimento foi repetido e, quando a cultura atingir o meio da fase exponencial de crescimento, ela foi utilizada para inocular o fermentador. O cultivo nesta fase foi feito em um fermentador de 50 litros.

d. Fermentação: a fermentação foi realizada a 37°C sendo que as condições de pH, aeração, formação de espuma, nível de produção de rejeito dentre outros fatores que podem afetar a produção de biomassa deverão ser monitoradas experimentalmente e controladas de forma a alcançar uma

eficiente expressão do produto desejado. As células são coletadas, de forma asséptica, no final da fase exponencial de crescimento e armazenadas a -70°C .

e. Otimização da recuperação de DNA pela lise em meio alcalino: Para realizar a lise alcalina, as células são descongeladas e re-suspensas em um tampão específico. Após serem homogeneizadas, o tampão de lise é adicionado e a suspensão é homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Após incubação, o tampão de neutralização é adicionado e após homogeneização, a suspensão é filtrada em membrana de nylon e o filtrado é coletado. Embora os volumes dos tampões de re-suspensão, lise e neutralização devam ser equivalentes, a determinação dos mesmos deverá ser feita experimentalmente monitorando o rendimento do plasmídeo e o nível de contaminação do mesmo em função da biomassa.

f. Estabelecimento do processo de purificação pela combinação de técnicas cromatográficas: Nesta etapa são utilizadas, para fins de otimização, três resinas e misturas das mesmas. Esta etapa não é detalhada neste momento devido a motivos de proteção industrial.

g. Validação do processo é assegurada pela avaliação do produto final em:

1. gel de agarose e análise de restrição: a presença do inserto no plasmídeo é verificada pela digestão deste com enzimas de restrição. Três μg de cada plasmídeo (pVAX e pVAX-hsp65 utilizados como modelo nesta fase) são incubadas com 20 unidades de Bam H1 (Pharmacia Biotech) a 30°

C por 3 horas. Em seguida, 10 unidades de Not 1 (Amersham Life Science) são adicionadas a cada amostra. Após 3 horas de incubação a 37°C, o produto da digestão de cada amostra, bem como plasmídeos não digeridos, são submetidos à eletroforese em gel de agarose (SIGMA) a 1%. A corrida é realizada a 60 V por 3 horas em aparelho Horizon TM11. 14 (BRL). 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL) é utilizado como marcador de peso molecular. O gel é corado com brometo de etídio e a visualização das bandas é feita em luz ultravioleta no ImageMaster VDS (Pharmacia Biothech);

2. medida da absorbância DO 260/280: A quantificação dos plasmídeos é feita por espectrofotometria em 260/280nm no aparelho Gene Quant II (Pharmacia Biotech);

3. teste de endotoxina: a avaliação da contaminação por endotoxina é realizada utilizando-se o método LAL;

4. determinação da expressão da proteína recombinante: a capacidade do pVAX-hsp65 em expressar a HSP65 em células de mamíferos é avaliada pela transfecção de células HeLa (Human epitheloid cervical carcinoma) e células J774 (macrófagos de linhagem tumoral originários de camundongos BALB/c) utilizando o Lipofectin® (GIBCO BRL) como agente de transfecção. Células J774- HSP65 (células J774 transfectadas com o vetor retroviral [pZIPNeoSV(x)] carreando o gene da HSP65 de *M.leprae*) são utilizadas como controle positivo do ensaio. As células são cultivadas em meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 2% de soro fetal bovino inativado por aquecimento, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. 100µL da suspensão de células (5×10^5 células) são adicionados à superfície de

lamínulas estéreis em placas de 24 poços e incubados por 3 horas para permitir a adesão celular. Após a incubação, as células são tratadas como a seguir:

- células J774 e HeLa recebem 1mL de meio RPMI servindo como controle negativo da expressão de HSP65
- células J774-hsp65 recebem 1mL de meio RPMI servindo como controle positivo da expressão de HSP65
- células J774 e HeLa recebem 1 mL de meio RPMI contendo pVAX- HSP65 complexado com Lipofectin® (GIBCO BRL) segundo instruções do fabricante.
- após 24 horas de incubação, os sobrenadantes das culturas são removidos e repostos com 1 mL de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. Análises de Rt-PCR e imunocitoquímica são realizadas 48 e 72 horas, respectivamente, após o início do teste.
- Rt-PCR: o RNA total é isolado das células por extração em Trizol (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) e precipitação em álcool seguida por um tratamento adicional com Dnase I (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) para evitar contaminação com DNA genômico e plasmidial. A amplificação por PCR é realizada utilizando pares de primers específicos da HSP65 de *M. leprae* (sense 5'–ATG-GCC-AAG-ACA-ATT-GCG-TAC-3'; antisense 5'-TTG-AGC-AGG-TCC-TCG-TAC-TCA-c-3'; dando uma banda de 1.4 kb). A PCR é conduzida preparando-se 50 mML da mistura como se segue: 0.5 mML de cada primer 5' e 3' na concentração de 100mM, 5 mML de tampão 10X da enzima Taq, 0.5 µL de Taq polimerase a 5 UI/µL (Gibco BRL, Grand Island,

NY, USA), 1 mM de dNTP a 10 mM; e 2 μ L da amostra. A mistura é submetida a 30 ciclos de amplificação em um termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc, Watertown, MA, USA). Em cada ciclo, a desnaturação é a 96°C por 45 segundos, o anelamento dos primers para formar o cDNA é conduzido a 60°C por 45 segundos, e a extensão é a 72°C por 90 segundos. O RNA mensageiro para β -actina é detectado por PCR (sense 5'-GTG-GGC-CGC-TCT-AGG-CAC-CAA-3'; antisense 5'-CTC-TTT-GAT-GTC-ACG-CAC-GAT-TTC-3'; dando uma banda de 902 bp) a fim de normalizar os níveis de RNA nas diferentes amostras. Os produtos da PCR são visualizados por iluminação ultravioleta após eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídio;

- **Imunocitoquímica:** para realização da imunocitoquímica, as células são lavadas por três vezes consecutivas em solução de PBS 0,01M, pH 7,2 contendo 1% de soro albumina bovina (BSA) (SIGMA). Em seguida elas são fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos à temperatura ambiente, e lavadas novamente. Todas as lavagens são realizadas por três vezes consecutivas. Posteriormente, realizar-se o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação com PBS contendo 3% de H₂O₂ por 30 minutos à temperatura ambiente. Após as lavagens com PBS-BSA 1%, as células são incubadas com tampão de bloqueio (3 % de soro de coelho, 1% de BSA e 0.01% de Triton X 100) por 1 hora à temperatura ambiente a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Em seguida, o anticorpo anti-HSP65 é adicionado e as células incubadas em câmara úmida a 4°C durante a noite. Após as lavagens consecutivas é feita a incubação com anticorpo

anti-IgG de camundongo conjugado à biotina (B-7022, Sigma) por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens as lamínulas serão incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com o complexo streptoavidina biotina – peroxidase (Streptoavidin –Dako Corporation, CA-USA). Após lavagem as reações são reveladas utilizando o substrato 3-3'-Diaminobenzidina (SIGMA) (5mg em 10 ml de PBS) adicionado a 180µl de H₂O₂ (20 volumes). A revelação foi feita por 10 a 20 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. As reações foram interrompidas com água destilada e as lamínulas contra-coradas com hematoxilina de Mayer previamente filtrada, por 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada por duas vezes, azuladas com água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5%) e, novamente lavadas com água destilada, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e montadas em lâminas com Bálsamo do Canadá. O controle negativo das reações foi realizado através da substituição dos anticorpos primários por PBS ou isotipos de imunoglobulinas não relacionados. A documentação da citoquímica foi realizada em microscópio Aristoplan (Leitz), acoplado ao sistema de fotografia MC80DX, e a análise foi realizada com auxílio do programa Image-pro Plus versão 3 para Windows após a captação da imagem da microscopia por meio de câmara digital SONY CCD-IRIS acoplada ao microscópio.

- avaliação da contaminação por RNA e por DNA genômico: é feita por eletroforese em gel de agarose.

- testes de esterilidade: são realizados de acordo com procedimentos farmacopeicos.

4.2 Desenho experimental

Pacientes portadores de carcinoma epidermóide do TADA, provenientes do ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP ou a ele encaminhados, foram selecionados seguindo critérios de inclusão no estudo proposto; prospectivo, não randomizado, aberto e não controlado.

Três grupos de seis pacientes, com a administração de três doses crescentes de 150, 600 e 1.200 µg, com aplicações nos dias 1, 21 e 42.

4.3 Critérios de elegibilidade

O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi preenchido por todos os pacientes, após explicação pormenorizada do estudo e suas implicações (anexo 1).

O critério cirúrgico de inclusão foi a presença de doença refratária ao tratamento padronizado constatada pela presença de doença residual ou recidivada considerada irresssecável pelo cirurgião responsável pelo tratamento e pela equipe de cirurgiões desse ensaio seguindo critérios padronizados [90,91,92].

Os critérios clínicos de inclusão no estudo foram:

- Idade maior que 18 anos.
- Compreender claramente e concordar com o estudo assinando o consentimento pós-informado.
- Índice de Karnofsky acima de 70% (vide classificação no anexo 3).
- Expectativa de vida aproximada maior que três meses.
- Diagnóstico histológico de carcinoma epidermóide de mucosa de cabeça e pescoço.
- Doença sem terapêutica curativa possível.
- Ausência de doença pulmonar debilitante.
- Dosagem de creatinina sérica inferior a 2mg/dL.
- Ausência de sinais clínicos de insuficiência cardíaca.
- Ausência de neutropenia, plaquetopenia ou anemia grave (hematócrito menor que 35%).
- Mais de um mês desde o último tratamento radioterápico.
- Mais de um mês desde a última dose de quimioterapia.
- Mais de um mês desde a última cirurgia.
- Ausência de infecções concomitantes.
- Ausência de outras doenças malignas (exceto carcinoma basocelular de pele localizado).
- Sem terapia biológica prévia (p.ex. terapia gênica baseada em vírus ou DNA recombinante).
- Sem doenças auto-imunes (p.ex. doença de Crohn, doença reumatóide).

- Sem antecedente de doença psiquiátrica (exceto depressão controlada).

- Se o paciente for do sexo feminino, deverá ser não gestante e pacientes em idade fértil devem ter teste de gravidez negativo e usar anticoncepcional.

Os critérios de exclusão foram:

- Uso de corticoesteróides dose média ou alta.
- Linfopenia (contagem de linfócitos abaixo do limite normal inferior do método).

4.4 Cronograma da aplicação da vacina

Os pacientes foram divididos em três grupos e receberam as doses de:

(Grupo A)- 150 µg, 6 pacientes

(Grupo B)- 600 µg, 6 pacientes

(Grupo C)- 1200 µg, 6 pacientes

O intervalo entre as três doses foi de 21 dias (Figura 1).

Figura 1

A confirmação de doença ativa antes da inclusão no estudo foi feita com biópsia tumoral e análise anatomopatológica. Uma semana após a terceira dose da vacina, foi realizada nova biópsia no local das injeções, visando uma comparação anatomopatológica. Este material foi também submetido à avaliação pela técnica de Rt-PCR para pesquisar a presença de mRNA da HSP65 do *M. leprae* e comprovar a transfecção do DNA injetado.

Para avaliação do tumor pré-vacinação os pacientes realizaram uma tomografia helicoidal, tanto para efeito de comparação após o tratamento como para documentar o preenchimento dos critérios de inclusão. Esta tomografia foi realizada em até sete dias antes da primeira injeção, e após a biópsia de comprovação da existência da neoplasia. O paciente também realizou exames laboratoriais para análise das condições clínicas e acompanhamento da toxicidade do tratamento (aplicação do CTCAE-<http://ctep.cancer.gov/forms/CTCAEv3.pdf>).

Aplicava-se a vacina através de injeção intratumoral guiada por ultrassonografia realizada pelo Serviço de Ultra-sonografia da Divisão de Clínica Radiológica. O aparelho de USG utilizado foi da marca Phillips, modelo HDI 5000 ou General Electric LOGIQ 9, com transdutor de 5 a 12 MHz. Para evitar os vasos sanguíneos cervicais e também áreas de necrose, antes da aplicação era realizada avaliação da vascularização da lesão com USG com Doppler.

O volume de injeção foi fixo de 1,5ml. Após assepsia da região alvo com álcool 70%, realizamos a injeção de 1,5ml da vacina, fracionada ou não dependendo das dimensões da lesão alvo. Não foi usada anestesia. Após a

aplicação, o paciente permanecia internado em observação pelo período mínimo de 24 horas.

Uma nova tomografia foi realizada após uma semana da terceira dose. Através da comparação do volume tumoral da primeira tomografia com a segunda, o tipo de resposta foi determinado com base nos critérios definidos pelo Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST- <http://imaging.cancer.gov/clinicaltrials/imaging>), que é o padrão de comparação de resposta em estudos clínicos com tumores sólidos criado pela Sociedade Americana de Radiologia.

A tomografia computadorizada de face e pescoço realizada em aparelho multislice, modelo IDT 10 ou IDT 16 da *Philips Medical Systems* (Cleveland), com 120kv, 200mAs, cortes de 1,5mm de espessura, reconstruídos para 5mm para a documentação em filmes.

O cálculo de volume foi realizado por dois radiologistas especializados na interpretação de exames na região da cabeça e do pescoço, através do desenho dos limites tumorais na estação de trabalho, com o *software Shaded Surface Display 3-D* (SSD 3-D) para a reconstrução de imagens tridimensionais. A seleção da área de cada corte foi obtida em cortes axiais com espessura de 2mm e foi realizada através de definição manual dos contornos das lesões, sucessivamente pelas regiões de interesse, obtendo-se o volume total calculado automaticamente pelo software, em mm³.

O exame e as reconstruções (Figuras 2,3 e 4), foram gravados em CD, com cópia.

Figura 2

Figura 3

Figura 4

Figura 2 Paciente participante no protocolo

Figura 3 Cálculo do volume tumoral

Figura 4 Determinação dos limites da lesão

Foi emitido laudo para cada exame, nele constando os cálculos volumétricos e/ou lineares.

Somente após a segunda tomografia foi realizada nova biópsia. O material da biópsia pré-vacinação e o da nova biópsia era submetido à comparação histopatológica.

O material desta segunda biópsia foi submetido a Rt-PCR para comprovação de transfecção e expressão gênica.

4.5 Extração de RNA.

Foram realizadas biópsias tumorais em centro cirúrgico, com anestesia local (lidocaína a 2%) após assepsia local com povidine tópico. O local era o mesmo local alvo das aplicações da vacina. Com o cuidado de manter as condições de esterilidade e segurança biológica na sala NB3 (nível biológico 3), os fragmentos foram depositados em tubos criogênicos de 2 mL contendo 200 µL de solução tampão e 1 mL de Trizol (Invitrogen). Posteriormente as amostras foram homogeneizadas com o auxílio do aparelho “Ultra Turrax T-8” (IKA-WERKE). Entre uma amostra e outra, a haste do homogeneizador foi lavada várias vezes com água DEPC (Dietil Pirocarbonato) 0,01%. Posteriormente as amostras foram depositadas em gelo para transporte e guardadas a -70°C até uso.

A extração continuou com o descongelamento das amostras em gelo. Posteriormente foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol e os tubos foram agitados por 15 seg. Logo foram deixados em

repouso a temperatura ambiente (TA) por 3 min. Após centrifugação a 10.000 x g por 15 min a 4°C a fase aquosa em que se encontrava o RNA foi transferida para outro tubo. Para precipitar o RNA, foi adicionado 0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de Trizol[®]. Após 10 min a TA, foi feita centrifugação a 12.000 x g por 10 min a 4°C. Depois, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se ao tubo 1 mL de etanol 70% seguido de re-suspensão do sedimento com o auxílio de uma pipeta. Outra centrifugação foi realizada, agora a 7.500 x g por 5 min a 4°C, e o etanol foi descartado por inversão do tubo. Este passo de lavagem do “pellet” foi repetido uma vez. Posteriormente os tubos ficaram em repouso para evaporação do etanol remanescente e logo o RNA foi re-suspenso em 25 µL de água estéril tratada com DEPC 0,01%. As soluções de RNA foram conservadas a -70°C até o uso.

4.6 Análise da integridade dos RNAs extraídos.

Para a realização da análise da integridade dos RNAs coletados, foram realizados ensaios de eletroforese em gel de agarose 1%.

Eletroforese das Amostras de RNA Total em Gel Denaturante.

As amostras de RNA total obtidas foram diluídas 100 vezes e analisadas por espectrofotometria no aparelho ULTROSPEC 2100 (Amersham Pharmacia), para quantificação e determinação da razão RNA/proteína ($r=A_{260}/A_{280}$) e RNA/fenol ($r=A_{260}/A_{230}$). Após a

quantificação, foi preparado um gel de agarose (Sigma, EUA) desnaturante 1,5% para visualização da integridade do RNA.

Um total de 35 mL de agarose fundida em água milli-Q autoclavada foi misturada com 10 mL de formaldeído 37% e 11 mL de tampão de migração MOPS 5X (20,6 g de MOPS dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 7,zero, ajustado com NaOH 2 N e adicionado 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; volume final ajustado para 1000 mL). Em paralelo, 4,5 µL contendo cerca de 2 µg de cada uma das amostras de RNA foram depositados em tubos Eppendorf, contendo 2,0 µL de tampão MOPS 5X; 3,5 µL de formaldeído 37% (Merck, Alemanha) e 10,0 µL de formamida. Os tubos foram incubados por 15 min a 65°C e após, transferidos imediatamente para gelo.

Posteriormente, foi adicionado 1 µL de brometo de etídeo diluído 3:1 (solução estoque 10 mg/mL) e 4 µL de tampão de amostra para eletroforese de ácidos nucleicos. Após eletroforese a 80 V durante 90 min, as bandas de RNA foram visualizadas em transiluminador UV e fotografadas em Polaroid ou no aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

Obtenção de DNA complementar (cDNA) por Retro-Transcrição (Rt-PCR)

Para a obtenção do cDNA a partir dos RNAs extraídos foi empregado 1 µg de RNA total de cada animal, a mesma foi tratado com a enzima "Amplification Grade DNase I" (Gibco BRL), para completa degradação do DNA que pudesse ter sido coletado junto ao RNA total, diminuindo assim a

possibilidade de amplificação inespecífica. Para cada 1 µg de RNA total adicionou-se 1µL da enzima “Amplification Grade DNase I”, 1µL do tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,4), 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂ e água livre de RNase e DNase (Gibco BRL), para completar o volume final de 10µL. A reação foi mantida por 15 minutos a 25°C, e a enzima inativada pela adição de 1µL de EDTA (25mM), seguido de 15 minutos de incubação a 65°C.

Posteriormente foi realizada a transcrição reversa do RNA para cDNA. Assim, foi adicionada a enzima “SuperScript™ II” (Gibco BRL), para a síntese de cDNA fita simples. Para cada amostra foi adicionado 1 µL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ a 500 µg/mL (Gibco BRL) e 1µL da mistura de dNTP a 10 mM. A amostra foi mantida por 10 minutos a 70°C e, em seguida, adicionou-se tampão da enzima numa concentração final de 50 mM (Tris-HCl, pH 8,4, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 0,02 mM de DTT). A amostra foi equilibrada por 2 minutos a 42°C e incubada com 1 µL (200 U) de “SuperScripit™” (Gibco BRL) durante 50 minutos a 42°C. A reação foi inativada pela incubação por 15 minutos a 70°C. A integridade dos cDNAs obtidos foi verificada através de eletroforese em gel de agarose.

4.7 PCR específica para o gene HSP65.

Com os cDNAs obtidos foi realizada a PCR específica para detecção de mensagem do gene HSP65. Para isso foram empregados os “primers”:

Senso:

Antisenso:

As condições da reação foram as seguintes:

5 μ L de PCR buffer

1,5 μ L de MgCl₂ 50mM

1 μ L dNTPs 10mM

1 μ L primer 5' (10pmoles)

1 μ L primer 3' (10pmoles)

0,25 μ L de Taq (5 U/ μ L)

água qsp 50 μ L

amostra cDNA (5 μ L)

Os programa de amplificação foi o seguinte:

1. 95°C – 3´
2. 80°C – 1´
3. 95°C – 45´´
4. 56°C – 1´
5. 72°C – 1´30´´
6. 72°C – 10´
7. 10°C – for ever

Foram realizados 35 ciclos do passo 3, 4 e 5.

APLICAÇÃO DO CTCAE

1) Internação e realização dos seguintes exames:

- Hemograma
- Coagulograma
- Sódio
- Potássio
- Cloro
- Magnésio
- Cálcio
- Fósforo
- Gasometria venosa
- Uréia
- Creatinina
- Eletroforese proteínas
- Urina 1
- Bilirrubinas totais e frações
- Aspartato Aminotransferase - AST/TGO
- Alanina Aminotransferase - ALT/TGP
- Gamaglutamiltransferase - GGT
- Fosfatase alcalina
- desidrogenase láctica - DHL
- Creatinofosfoquinase CPK
- Colesterol total e frações

- Triglicerídeos
- Perfil de ferro
- VHS - velocidade de hemossedimentação
- PCR
- Complemento C3
- Complemento C4
- Coplemento total - CH100
- FAN - fator anti-núcleo
- Anti-DNA
- Anti-TPO
- Anti-TG anti tireoglobulina
- Coombs direto
- Tipagem ABO Rh
- Glicemia
- Ácido úrico
- T4 livre, T3, T4 , TSH
- Protoparasitológico de fezes - 1 amostra
- Sorologias: HIV, Hepatite B e C, Vírus Epstein Barr, Citomegalovírose, Sífilis, Doença de Chagas, Herpes simples
- Linfócitos CD4, CD8
- Testes cutâneos tardios (PPD, tricofitina e candidina)
- IgE, IgA, IgM, IgG
- Raio X de tórax Posteroanterior e Perfil
- Eletrocardiograma

- Ecodopplercardiograma
 - Ultrassonografia de abdome total
- 2) Aplicações da vacina já padronizada (figura 1).
- 3) Seguimento:

Avaliação semanal no ambulatório de cirurgia de cabeça e pescoço semanalmente no primeiro mês após as 3 doses e posteriormente mensais até 90 dias. O objetivo destas consultas era a avaliação geral e específica do paciente. Deu-se ênfase a avaliação do trofismo e estado geral além do exame detalhado da região de cabeça e pescoço e aspectos ligados ao tratamento como dor, deglutição, respiração e eventos adversos classificando os de acordo com o CTCAE. Conforme necessidade os pacientes eram avaliados além do cronograma pré-estabelecido (na presença de intercorrências, por exemplo).

Novos exames laboratoriais foram colhidos semanalmente (nas 3 semanas seguintes à aplicação). A periodicidade então passava a ser quinzenal. Em caso de suspeita de evento adverso ou complicações, coletas extras eram realizadas.

Os exames periódicos para avaliação do CTCAE eram:

- Hemograma
- Sódio
- Potássio
- Cloro
- Magnésio
- Cálcio

- Fósforo
- Gasometria venosa
- Uréia
- Creatinina
- Eletroforese proteínas
- Bilirrubinas totais e frações
- Aspartato Aminotransferase - AST/TGO
- Alanina Aminotransferase - ALT/TGP
- Gamaglutamiltransferase - GGT
- Fosfatase alcalina
- desidrogenase láctica DHL
- Creatinofosfoquinase - CPK
- VHS - velocidade de hemossedimentação
- Glicemia
- Ácido úrico

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Foram incluídos 21 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, avançado, em conformidade com os critérios de inclusão previamente descritos. A predominância foi de homens (18 ou 85,7%). Apenas um paciente não era etilista e tabagista. A idade variou de 33 a 73 anos (média de 57,71 anos). O sítio primário da doença envolvia a cavidade oral em 7 pacientes (33,3%), laringe em 7 pacientes (33,3%), hipofaringe em 2 pacientes (29,5%) e orofaringe em 5 pacientes (23,8%). O tratamento inicial foi cirurgia seguida de radioterapia em 17 pacientes (80,95%), e 4 pacientes foram submetidos à radioterapia e quimioterapia. Apenas 2 apresentavam-se como estágio III enquanto 19 tinham estágio IV.

Durante o protocolo 8 indivíduos faleceram. Dois receberam apenas uma dose, quatro receberam duas doses e dois receberam as três doses, porém faleceram antes da tomografia de controle. No grupo B ocorreram eventos adversos graus 3 e 4, e optamos por diminuir a dose para 400 µg (previsão inicial de escalonamento para 1200µg no grupo C). Após o falecimento de três pacientes no grupo C, por eventos não relacionados com a ação da vacina, ampliamos o número de pacientes para nove (conforme o CTCAE o grupo C deveria ter no mínimo seis pacientes estudados).

Inicialmente previsto em 18, o número de pacientes (n) foi aumentado para 21, dois grupos de seis pacientes e um de nove. Os pacientes

receberam a aplicação de 3 doses da vacina, através de injeção intratumoral nos dias 0, 21^o e 42^o

Em 15 pacientes foram realizadas as duas tomografias propostas, porém em dois pacientes não foi possível a determinação precisa do volume tumoral, devido ao número de restaurações metálicas de um paciente e por problemas com a gravação do exame no outro. Nos 13 pacientes passíveis de análise, ocorreram quatro respostas parciais (diminuição de 30% ou mais no volume tumoral) e estabilidade da lesão em um caso. Em nove casos houve progressão da doença (aumento de 30% ou mais no volume tumoral).

Para uma análise mais detalhada dos pacientes vamos utilizar a mesma divisão em grupos usada no escalonamento de dose.

Um grupo designado como grupo A que recebeu dose de 150 µg, grupo B 600 µg e grupo C 400 µg.

O grupo A composto de 6 indivíduos que receberam a dose de 150 µg por injeção apresentava 2 mulheres e 4 homens (Tabela1).

O primeiro paciente era um homem de 64 anos, portador de um tumor de seio piriforme T3N3M0. Foi tratado com radioterapia e quimioterapia sem sucesso. Após confirmação histológica de doença residual realizou uma tomografia que mostrou um volume residual de doença de 52,87cm³, que invadia musculatura profunda do pescoço e fáscia pré-vertebral. Recebeu as três doses sem eventos adversos incapacitantes (graus 3 e 4). A biópsia posterior mostrou doença ativa e o volume tumoral apresentou redução de 52,72% para 25 cm³. (Figuras 4 e 5) Essa diminuição observada de volume

tumoral foi acompanhada de melhora clínica. No D160 foi detectado aumento de volume de outro linfonodo da região. Como apresentou resposta ao tratamento, com redução do volume tumoral, recebeu novas doses a título de uso compassional (uma vez que o indivíduo beneficiou-se do tratamento). No entanto, dessa vez não foi observada resposta e o paciente faleceu. Como apresentou resposta ao tratamento, com redução do volume tumoral, recebeu novas doses a título de uso compassional (uma vez que o indivíduo se beneficiou do tratamento). Faleceu no dia 389 após a primeira dose por progressão da doença e infestação tumoral parasitária com hemorragia extensa e choque hipovolêmico.

Figura 4 – Tomografia e reconstrução de volume pré tratamento

Figura 5 – Tomografia e reconstrução de volume pós tratamento

O segundo paciente, também homem de 59 anos era portador de um rT4aN2 de cavidade oral. Foi submetido a quatro cirurgias e radioterapia pós-operatória. Após a quarta recidiva locorregional foi considerado incurável pela equipe que o assistia e recebeu quimioterapia paliativa. Após confirmação histológica de doença residual realizou uma tomografia que mostrou um volume residual de doença de 19,47cm³. Recebeu as três doses sem eventos adversos grau 3 e 4. O volume final foi de 56,11cm³, progressão com aumento de 167,64%. Faleceu no 274º dia, por progressão da doença.

O terceiro paciente, uma mulher de 59 anos, era portadora de uma neoplasia de orofaringe rT4aN0M0, recidivado localmente após ter sido submetida a tratamento cirúrgico seguido de radioterapia. O volume inicial era de 84,36 e o final de 48,12 cm³ demonstrando resposta parcial (diminuição de 42,95%). Apresentou evento grau 3, dor local após a terceira injeção que cedeu a analgesia habitual. Faleceu em consequência de progressão da doença no 100º dia.

O quarto paciente era uma mulher de 49 anos, portadora de lesão rT3N1, recidivada em laringe após tratamento com radioterapia e quimioterapia. O volume inicial foi de 4,88 e o final de 1,16cm³ com resposta parcial (redução de 76,22%). Apresentou evento adverso grau 3, edema cervical após a primeira injeção. Atualmente está viva em seguimento ambulatorial, com recidiva local do tumor no D503, que está sendo tratada com quimioterapia.

O quinto paciente, um homem de 56 anos com uma recidiva local de um tumor de cavidade oral, rT3N1M0, após cirurgia e radioterapia, com doença inoperável pela localização de recidiva. Apresentou progressão da doença, aumento de 98,04% (volume inicial 87,04 e final 172,40cm³). Apresentou evento adverso grau 3, astenia provavelmente não relacionada ao tratamento, após a terceira injeção. Faleceu no 148º dia como consequência da progressão da doença.

O sexto e último paciente do grupo A era um homem de 64 anos, portador de uma recidiva cervical de uma lesão de laringe rT4aN3M0 (submetido à cirurgia e radioterapia). Faleceu no 37º dia devido a hemorragia e choque hipovolêmico após curativo de extensa úlcera cervical. Recebeu apenas duas aplicações, portanto não completou o estudo.

Paciente	Gênero	Idade	Localização do tumor	Estádio na inclusão	Volume tumoral (cm ³)	Tratamento	IMC	Karnofsky (%)
1	M	64	Seio piriforme	rIVa	52,87	RT/QT	19,92	90
2	M	59	Cavidade oral	rIVb	19,47	CIRURGIA/RT/QT	22,23	90
3	F	59	orofaringe	rIVa	84,36	CIRURGIA/RT	21,87	90
4	F	49	Laringe	rIII	4,88	RT/QT	17,74	80
5	M	56	Cavidade oral	rIII	87,05	CIRURGIA/RT	18,24	80
6	M	64	Laringe	rIVb	146,42	CIRURGIA/RT	17,55	80

Tabela 1

O grupo B com 6 indivíduos que receberam a dose de 600 µg foi constituído de 1 mulher e 5 homens (Tabela2).

O sétimo paciente do estudo (primeiro do grupo B) era um homem, de 62 anos, que apresentava recidiva local rT4bN0M0 de lesão de cavidade oral, que foi tratada inicialmente com cirurgia seguida de radioterapia. A lesão recidivada apresentava contra-indicação de cirurgia pela sua extensão. Apresentou progressão da doença com aumento de volume tumoral de 72,75% (volume inicial de 81,53 e final de 140,85cm³). Apresentou astenia grau 3 e dor grau 4 após a aplicação da terceira dose. Evoluiu a óbito por progressão da doença com sangramento e choque hipovolêmico no dia 105.

O oitavo paciente era uma mulher de 73 anos, portadora de uma lesão recidivada em cavidade oral e região cervical, rT4aN3M0 (após cirurgia e radioterapia).Apresentou dor grau 4 e dispnéia após a segunda dose. Evoluiu para óbito no 38º dia. A autópsia revelou que a causa mortis foi linfangite carcinomatosa pulmonar e insuficiência respiratória, portanto progressão da doença.

O nono paciente era um homem de 55 anos, portador de neoplasia de cavidade oral recidivada locorregionalmente (rT4aN1M0) após tratamento com cirurgia e radioterapia em outro serviço. A avaliação de volume da lesão na cavidade oral não foi possível devido à interferência de restaurações metálicas dentárias. Apresentou eventos adversos, dor grau 3 após a primeira dose e dor e edema grau 4 após a terceira dose, o que era esperado visto que o paciente apresentava uma extensa lesão ulcerada no assoalho bucal, com dor grau 3 antes da primeira injeção. Apresentou também

infecção local. Clinicamente houve progressão da doença. Ocorreu óbito no dia 70 por sangramento e choque hipovolêmico.

O décimo paciente era um homem de 65 anos portador de uma lesão de laringe (rT4bN0M0) recidivada após cirurgia e tentado resgate com radioterapia e quimioterapia. Não apresentou eventos adversos e apresentava-se vivo sem sinais de doença local. A biópsia pós-tratamento não evidenciou a presença de neoplasia. No D542 foi diagnosticado segundo tumor primário no esôfago, também carcinoma epidermóide, que está em tratamento, sem evidência de doença na laringe.

O décimo primeiro paciente era um homem de 49 anos, portador de uma lesão recidivada em orofaringe (rT4bN0M0). Foi submetido à cirurgia e radioterapia como tratamento inicial e quimioterapia após a recidiva. Apresentou estabilidade da doença, com redução de 2% (volume inicial de 178,62 e final de 175,03cm³). A segunda biópsia não evidenciou presença de neoplasia, possivelmente pela extensa área de necrose existente. Após a terceira dose, no D50 apresentou edema grau 3 e pericardite que foi tratada com sucesso. Nesse momento apresentava anasarca com hipoalbuminemia que foi corrigida juntamente tratamento para possível doença auto-imune, apesar de não haver outro indício clínico favorável a essa suspeita. Evoluiu para óbito no D228 decorrente da progressão da doença para a base do crânio e foi submetido a autópsia que não evidenciou doença auto imune. A pericardite foi então considerada possivelmente relacionada ao tratamento. Evoluiu para óbito por sangramento e choque hipovolêmico no dia 228.

O décimo segundo paciente era um homem de 45 anos. Apresentava uma lesão recidivada de laringe, rT4aN2M0, que foi tratada inicialmente com cirurgia seguida por radioterapia. Não completou o protocolo por que evoluiu com complicações de uma gastrostomia endoscópica, faleceu devido a hemorragia digestiva e choque hipovolêmico, logo após a primeira dose, no D22.

Paciente	Gênero	Idade	Localização do tumor	Estádio na inclusão	Volume tumoral (cm ³)	Tratamento	Karnofsky (%)
7	M	62	Cavidade oral	rIVb	81,57	CIRURGIA/R T	90
8	F	73	Cavidade oral	rIVb	8,47	CIRURGIA/R T	90
9	M	55	Cavidade oral	rIVa	8,26	CIRURGIA/R T	90
10	M	65	Laringe	rIVb	5,63	CIRURGIA/R T/QT	90
11	M	51	Orofaringe	rIVb	328,1	CIRURGIA/R T/QT	90
12	M	45	Laringe	rIVa	59,56	CIRURGIA/R T	90

Tabela 2

O grupo C contou com 9 indivíduos que receberam a dose de 400 µg, todos homens (Tabela3).

O décimo terceiro paciente era um homem de 64 anos com lesão de cavidade oral rT4bN2a, que foi inicialmente tratada com radioterapia e quimioterapia. Apresentou progressão da doença com acréscimo de 214,09%, (volume inicial de 70,49 e volume final de 222cm³). Evoluiu com

eventos adversos grau 3, pneumonia após a primeira dose, periodontite após a segunda e edema de face após a terceira. Faleceu devido a progressão da doença e caquexia no dia 186.

O décimo quarto paciente, homem de 54 anos foi submetido inicialmente à cirurgia seguida de radioterapia por uma lesão de laringe. Apresentava extensa recidiva peri-traqueostômica, rT4bN0M0. Recebeu duas doses e após insuficiência respiratória foi internado em unidade de terapia intensiva. Submetido a ventilação mecânica, culminou com óbito por falência de múltiplos órgãos no dia 49.

O décimo quinto paciente, homem de 64 anos era portador de lesão de laringe recidivada após cirurgia e radioterapia, rT3N3M0. Também apresentou intercorrência após a segunda dose, sangramento profuso que levou a óbito por hipovolemia no dia 41.

O paciente nº16, homem de 33 anos era portador de lesão recidivada na orofaringe pós-cirurgia e radioterapia, rT4bN0M0. Recebeu as três doses com progressão da doença de 167,54% (volume inicial de 22,34 e final de 59,77cm³). Evoluiu com dor grau 3 após a primeira dose e grau 4 após a terceira dose, considerada possivelmente relacionada. Evoluiu para óbito no D181 por progressão da doença e caquexia.

O décimo sétimo paciente, homem de 67 anos portador de tumor de hipofaringe tratado com quimioterapia e radioterapia, recidivado localmente, rT4aN0M0. Evoluiu com sangramento por fístula faringo-traqueal levando a óbito no D21, que foi considerado possivelmente não relacionado.

O décimo oitavo paciente era um homem de 63 anos, portador de neoplasia de orofaringe tratado com cirurgia e radioterapia. Apresentava recidiva locorregional, rT3N3M0. Recebeu as três doses com progressão de 23,29% (volume inicial de 8,07 e final de 9,95cm³). Faleceu no dia 171 em consequência de progressão tumoral e caquexia.

O décimo nono paciente, homem de 49 anos apresentava recidiva locorregional (rT4bN2M0) de lesão inicialmente de orofaringe tratada com cirurgia e radioterapia. Após as três doses teve dor local e astenia grau 3. Ocorreu progressão da doença com acréscimo de volume de 174,90% (volume inicial de 896,23 e final de 265,54cm³). Faleceu no 100º dia por progressão da doença e caquexia.

O vigésimo paciente homem de 67 anos, com recidiva locorregional de carcinoma epidermóide de cavidade oral (rT3N2M0), tratado inicialmente com cirurgia e radioterapia. Por problemas técnicos teve a segunda medição de volume comprometida, mas clinicamente apresentou progressão da doença. Evoluiu com óbito no 118º dia por progressão tumoral e caquexia.

O vigésimo primeiro e último paciente, homem de 50 anos, era portador de uma lesão de laringe T2N2, inicialmente tratada com radioterapia e quimioterapia. Apresentava recidiva locorregional rT2N3M0. Recebeu as três doses da vacina com progressão de 500,45% (volume inicial de 12,23 e final de 79,44cm³). Após a terceira dose apresentou edema de língua grau 4 evoluindo para insuficiência respiratória e necessitando traqueostomia. Faleceu após 127 dias da primeira dose por progressão da doença e caquexia.

Paciente	Gênero	Idade	Localização do tumor	Estádio na inclusão	Volume tumoral (cm ³)	Tratamento	Karnofsky (%)
13	M	64	Cavidade oral	IVb	70,49	RT/QT	90
14	M	54	Laringe	IVb	171,69	CIRURGIA/R T	80
15	M	64	Laringe	IVb	78,78	CIRURGIA/R T	90
16	M	33	Orofaringe	IVb	22,34	CIRURGIA/R T/QT	80
17	M	66	Seio piriforme	IVa	85,24	CIRURGIA/R T/QT	80
18	M	63	Orofaringe	IVb	8,07	CIRURGIA/R T	90
19	M	49	Orofaringe	IVb	96,23	CIRURGIA/R T	70
20	M	67	Cavidade Oral	IVa	81,88	CIRURGIA/R T	90
21	M	50	Laringe	IVb	13,23	RT/QT	90

Tabela 3

Dos 21 pacientes, 15 receberam as 3 injeções e foram submetidos a biópsia do tumor injetado. O material foi em parte enviado para exame anátomo patológico e em parte utilizado para a realização de RTPCR para HSP65 no intuito de demonstrar transfecção do DNA injetado.

As peças foram submetidas a exame anátomo-patológico com cloração por hematoxilina-eosina. Os resultados estão no gráfico 1.

Gráfico 1

O material das biópsias foi preservado em nitrogênio líquido para transporte até Laboratório de Investigação Médica 21 (LIM 21). Foi preservado em freezer apropriado a -80°C . O material foi então enviado para o laboratório de vacinas gênicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e realizado Rt-PCR. A qualidade do RNA extraído foi variada. Das 14 amostras de tumor pós-vacinação, quatro apresentavam RNA de baixa qualidade, quatro de qualidade intermediária e seis de boa qualidade.

Como controle negativo utilizamos água destilada e rna proveniente da biópsia de um paciente portador de carcinoma epidermóide, mas que não pertencia ao protocolo. A presença de expressão de RNA que codifica HSP-65 do *Mycobacterium leprae* foi evidenciada em onze amostras incluindo um controle negativo tumoral. Os dois controles positivos, primer do HSP e β actina também expressaram HSP 65.

Análise Estatística

Foi realizada a comparação entre a sobrevida dos pacientes que responderam ao tratamento com diminuição do tumor e os pacientes que apresentaram aumento do volume tumoral. Utilizou-se o método de Kaplan-Meier para construção das curvas de sobrevida. As curvas segundo os subgrupos (regressão e progressão tumoral – excluído o único paciente que teve estabilização) foram comparadas com o teste log-rank. Apresentou-se média e desvio padrão do tempo de segmento [93].

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com $p = 0,0535$ (Gráfico 2).

Gráfico 2

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O CEC de cabeça e pescoço tem uma importante ligação com o consumo de álcool e o tabagismo [13,14,15,16]. Na presente casuística apenas um paciente não era tabagista e etilista. A proporção de pacientes homens/mulheres foi de 6 para 1 e a média de idade de 57 anos, o que condiz o perfil relatado dos doentes com CEC de cabeça e pescoço no país [94]. Dos 21 pacientes, dez apresentavam traqueostomia no início do protocolo e dois foram traqueostomizados durante o estudo. Com exceção dos dois pacientes ainda vivos os outros 19 utilizaram sonda enteral para alimentação. Nos portadores de lesões avançadas de cabeça e pescoço, com a progressão locorregional da neoplasia, a utilização de sondas para alimentação e traqueostomias é freqüente e ocorre pelo comprometimento direto pela neoplasia e pela compressão de estruturas locais. Kottwall et al já demonstrou através do estudo de autópsias de pacientes que morreram com CEC do TADA, que a maioria dos pacientes morreram com doença locoregional e mais de 90% dos pacientes com metástases apresentavam doença no pescoço ou no sítio primário. Também observou-se esta agressividade locorregional, a causa do óbito em 9 pacientes foi progressão da neoplasia com caquexia e em 7 pacientes hipovolemia após sangramento

relacionado ao tumor. Apenas uma paciente morreu em decorrência de disseminação à distância, com linfangite carcinomatosa pulmonar.

Para avaliação do tratamento é importante a determinação do estado em que se encontravam os pacientes antes do tratamento e como seria a evolução natural da doença. Alguns autores já demonstraram que fatores como estado geral, extensão tumoral, presença de tratamento prévio e necessidade de tratamento paliativo são fatores que influenciaram o resultado de quimioterapia paliativa em pacientes portadores de CEC do TADA incurável [95]. No que diz respeito à evolução natural da doença avançada, Kowalski e Carvalho observaram uma sobrevida média de 3.82 meses em 808 pacientes. Para aqueles autores, o estado geral dos pacientes foi estatisticamente significativo para prever a sobrevida ($p < 0.001$). Os pacientes que foram submetidos ao ensaio com a vacina de Dna HSP-65 apresentavam doença incurável. Não existia a possibilidade de tratamento cirúrgico ou radio/quimioterápico com intuito curativo. Apresentavam recidivas locorregionais, sem doença à distância diagnosticada na inclusão no protocolo. No início do estudo todos necessitavam de palição para dor. Em apenas uma paciente não eram utilizados analgésicos potentes. A necessidade de palição da dor é um dos critérios que indicam pouca chance de resposta ao tratamento paliativo.

Os pacientes que apresentaram progressão da doença apresentaram piora significativa da dor, mas os quatro pacientes que apresentaram diminuição da lesão evoluíram com melhora da dor e diminuição do uso de analgésicos. A dor parece ser indício de progressão tumoral, apesar de que

nas primeiras 48 horas após a punção observamos sinais inflamatórios locais e aumento da dor local em todos os pacientes, mas com diminuição no terceiro dia após a injeção.

O estado geral debilitado pelo consumo neoplásico e pelas limitações de alimentação determinou aos pacientes uma diminuição da resposta imune. Como sinal desta imunodeficiência foi observado que os pacientes apresentavam testes cutâneos de sensibilidade (que mede a imunidade celular) diminuídos, sendo alguns pacientes anérgicos. Em 4 pacientes (12º, 15º, 17º e 21º) que tinham PPD maior ou igual a 10 mm prévio e sem evidência de tuberculose ativa ocorreu inflamação tumoral exuberante após aplicação da vacina. Este fato associado à positivação do PPD após o esquema de vacinação nos pacientes 4 e 10 (e estes tiveram redução do volume tumoral) leva a suspeita de que a resposta antitumoral acompanhou a perda da anergia à HSP65 homóloga presente no extrato do PPD.

Com o reconhecimento do CEC através da expressão conjunta de antígenos tumorais e da proteína de choque térmico HSP65 do *Mycobacterium leprae* objetivou a quebra da tolerância imunológica do hospedeiro em relação ao tumor. Um fato relevante na geração de uma resposta imune eficaz, mas que dificultou a demonstração de expressão do HSP nas biópsias realizadas é a homologia do HSP65 injetado e o humano. A presença de um teste falso positivo em uma amostra de um paciente portador de CEC de cavidade oral, que não recebeu a vacina, demonstrou que o HSP humano estava sendo reconhecido. Dessa forma, apesar de termos evidenciado transfecção e transcrição do HSP65 em vários pacientes

através da detecção do seu RNA, não podemos concluir com certeza que esse RNA não era constitutivo humano (ex: HSP60) que apresentou reação cruzada. Há necessidade de criação de um primer mais específico para a HSP65 de *Mycobacterium leprae*.

O método de aplicação da vacina de DNA HSP-65 do *M.leprae* apresentou algumas vantagens. Diferentemente de outras formas de imunoterapia que vem sendo testadas, não depende de uma confecção individualizada para cada paciente. A imuno-estimulação é in-vivo, o que, comparando-se com as formas que utilizam estimulação ex-vivo, implica em custos e complexidade de tratamento menores. Dispensa-se o manejo de material biológico facilitando a logística de tratamento e possibilitando que este seja utilizado em centros hospitalares menos complexos.

Com a aplicação da vacina observamos resposta local e regional, com exuberante resposta inflamatória em alguns pacientes, inclusive com o aparecimento de linfonodomegalias reacionais. O primeiro paciente do protocolo apresentou uma reação inflamatória reacional em um linfonodo cervical próximo ao local de injeção intratumoral. Vale salientar que este linfonodo era doloroso e que com o passar do tempo após as injeções ocorria involução deste linfonodo. Este indivíduo apresentou diminuição tumoral e apresentou uma sobrevida de 388 dias. Os efeitos adversos observados foram principalmente decorrentes desta inflamação tumoral, como aumento da dor local, edema, pequenos sangramentos e piora da astenia. Porém estes efeitos observados também podem ser devidos à destruição tumoral ou à resposta ao estímulo imunológico decorrente da aplicação da vacina.

Seriam eles então efeitos de toxicidade indesejada ou resposta adequada ao estímulo vacinal? Foi importante a observação que nenhum paciente apresentou toxicidade significativa incapacitante ao uso da medicação, apenas eventos adversos potencialmente relacionados à vacina.

Os pacientes do segundo grupo que apresentaram efeitos adversos graus 3 e 4, tinham progressão da doença caracterizada no seguimento clínico e confirmada na segunda tomografia computadorizada (quando esta foi realizada). Pelas características da progressão do CEC de cabeça e pescoço a dor e o edema local são conseqüências esperadas com a progressão tumoral. Este fato ficou ainda mais evidente com acompanhamento dos pacientes, e comparação da sua evolução com resultados de necropsia. Nos pacientes em que foi realizada, a necropsia demonstrou progressão agressiva da neoplasia, inclusive em um dos casos com carcinomatose pulmonar. Esse fato leva a uma linha de pensamento que afirma que portadores de CEC de cabeça e pescoço não apresentam um alto índice de metástases à distância porque não há tempo para o seu diagnóstico, e que com a melhora do controle locorregional ocorrerá um aumento na sua incidência. Esse fato realça mais ainda as possibilidades terapêuticas da vacina de DNA HSP65, que também age sistemicamente através do epitope spreading já citado anteriormente.

Em uma paciente ocorreu derrame pericárdico não constritivo assintomático e os dados não foram conclusivos quanto à definição de um evento auto-imune, pois não foram verificados auto-anticorpos na circulação e nem outro sinal ou sintoma que sugerisse síndrome autoimune até o óbito

do paciente (125 dias após diagnóstico deste evento). O paciente apresentava associado ao quadro tumoral, anemia grave e hipoalbuminemia, que são causas possíveis de derrame pericárdico. Classificou-se o evento como possivelmente relacionado, porque não existia ecocardiograma prévio (embora ela falhasse no critério de inclusão, a paciente foi mantida, por considera-se um desvio menor do protocolo, muito embora isso tenha prejudicado a efetiva constatação de um possível evento adverso). Cabe salientar que apesar de o uso de uma vacina de HSP65 poder teoricamente induzir uma resposta contra a proteína e potencialmente uma resposta autoimune, Faulds et al [86] demonstrara em 1995 que apesar de ocorrer resposta imune com formação de anticorpos contra antígenos HSP 65 e 70 (HSP das espécies estudadas) em pacientes com lupus eritematoso sistêmico (LES) e em animais com LES experimental, não ocorreu correlação clínica entre a atividade da doença e os títulos dos anticorpos. Isto sugeriu que podem ser anticorpos que não participam da resposta imune [61].

Os casos de sangramento tumoral maciço não puderam ser relacionados ao uso da vacina, pois acompanhavam a evidente progressão e invasão tumoral. Entretanto recomenda-se uma maior vigilância de tais eventos em novos estudos e mencionar uma associação possível de hemorragias com o uso da vacina no TCLE.

Observou-se freqüentemente infecções no sítio tumoral e ao seu redor o que pode ser relacionado à aplicação da vacina, porém estes pacientes apresentavam lesões ulceradas em regiões contaminadas ou expostas

(boca, pescoço), o que por si só já justifica a ocorrência de processos infecciosos locais.

Como a aplicação é feita através de injeção intratumoral e não requer exploração cirúrgica, o procedimento pode ser realizado em dependências hospitalares de baixa complexidade. Apesar de em muitos casos existir a visualização do tumor a ser injetado, utilizamos a injeção guiada por USG com Doppler pela freqüente relação com grandes vasos cervicais e necrose tecidual dos tumores recidivados.

Ao todo foram incluídos 21 indivíduos, com sete óbitos antes do final do protocolo. Todos os sete pacientes faleceram em decorrência de complicações relacionadas à progressão do câncer, nenhum devido à toxicidade da vacina.

A toxicidade significativa é predominantemente local, e é inferior aos efeitos tóxicos de duas formas de tratamento padrão da doença avançada (radioterapia e quimioterapia). A forma de cálculo da dose inicial baseou-se na razão de cálculo por peso dos modelos animais. A dose inicial geralmente equivale a 1/10 da dose em camundongos em mg/m^2 de superfície corpórea, quando não for tóxica para nenhuma espécie testada. Quando houver toxicidade a dose inicial é a mínima que não demonstrou produzir mais do que efeitos mínimos e reversíveis na espécie mais sensível testada. Outros ensaios com vacinas de DNA sugerem que doses de 0,5 a 4 mg podem ser utilizadas com segurança, então propusemos uma dose máxima de 1,2 mg. O cronograma de administração é determinado por diversos fatores incluindo: evidências de cronogramas em estudos experimentais in vivo,

farmacocinética, mecanismo de ação e dados clínicos relevantes se existirem.

Os pacientes que finalizaram o protocolo apresentaram uma taxa de resposta (38,4%) maior do que a observada na literatura 15 a 30% em pacientes portadores de CEC avançado recidivado e submetidos a quimioterapia [32,33]. Uma comparação mais efetiva com outras séries é difícil porque a maioria dos estudos sobre pacientes com recidivas avançadas de CEC de cabeça e pescoço incluem pacientes portadores de doença metastática, mas sem doença local, o que não é idealmente comparável com recidivas locorregionais. Outros estudos incluem os pacientes com lesões recidivadas passíveis de tratamento cirúrgico e ou radioterápico, que tem resultados melhores que os pacientes somente passíveis de tratar-se paliativamente. Como exemplo podemos citar o trabalho realizado no Hospital AC. Camargo, onde pacientes portadores de lesões N3 foram tratados com cirurgia, radioterapia e cuidados paliativos conforme a possibilidade. Os pacientes que receberam apenas cuidados paliativos apresentaram índice de sobrevida em 1 ano de 15,9% [34]. Com relação aos pacientes que completaram o presente protocolo, a sobrevida em 1 ano foi de 30%. Forestiere e Jacobs [8,96] observaram sobrevida média de 6 meses em pacientes submetidos a quimioterapia paliativa. Quando foram associados Cisplatina e Docetaxel houve uma melhora na sobrevida, de 6,5 a 9,6 meses [97,98,99].

A sobrevida dos pacientes variou de 21 a 800 dias com média de 190, considerando os dois pacientes ainda vivos com sobrevida de 800 dias

(Tabela 4). Porém estes dados referem-se à sobrevida após a aplicação da primeira dose da vacina. O tempo médio entre o diagnóstico de impossibilidade de terapêutica curativa da recidiva e a inclusão no protocolo foi de quatro meses. A comparação com a sobrevida apresentada em pacientes que não foram submetidos a nenhum tratamento parece favorável [35], resta saber se esta melhora foi devido ao uso da vacina ou a uma melhoria nos cuidados devido ao seguimento mais aprofundado, que pode ser responsável por este resultado ou se os pacientes tiveram benefício com o tratamento.

A existência de quatro pacientes que tiveram mais de um ano de seguimento após a primeira dose pode indicar que houve impacto na evolução dos tumores recidivados destes pacientes. A comparação entre a sobrevida destes quatro pacientes com os nove que apresentaram progressão tumoral mostrou sobrevida estatisticamente superior. Cabe dizer que este não é o objetivo do estudo e, portanto os números não são suficientes para que seja possível tirar nenhuma conclusão sobre sobrevida.

Quanto ao futuro, verificamos a necessidade de realização de ensaios em pacientes em condições clínicas e imunológicas mais preservadas, se possível em pacientes que apresentem doença em estágio mais precoce. Poderíamos então avaliar de forma mais precisa os efeitos da utilização da vacina de DNA HSP65 do *Mycobacterium leprae* no combate ao CEC do TADA.

Paciente	Data da 1ª dose	data da 2a tomografia	Data do óbito	Sobrevida(dias)*
1	22/01/2004	11/03/2004	14/02/2005	389
2	31/03/2004	20/05/2004	30/12/2004	274
3	31/03/2004	20/05/2004	29/07/2004	100
4	14/05/2004	01/07/2004	vivo	878§
5	20/05/2004	21/07/2004	15/10/2004	148
6	27/05/2004	não	03/07/2004	37
7	27/05/2004	06/08/2004	09/09/2004	105
8	03/06/2004	não	11/07/2004	38
9	17/06/2004	05/08/2004	25/08/2004	69
10	24/06/2004	11/08/2004	vivo	837•
11	13/08/2004	01/10/2004	29/03/2005	228
12	03/09/2004	não	25/09/2004	22
13	08/10/2004	04/01/2004	12/04/2005	186
14	23/10/2004	não	11/12/2004	49
15	04/11/2004	não	15/12/2004	41
16	10/01/2005	28/02/2005	10/07/2005	181
17	14/01/2005	não	04/02/2005	21
18	11/02/2005	31/03/2005	01/08/2005	171
19	25/08/2005	13/10/2005	03/12/2005	100
20	04/10/2005	-	30/01/2006	118
21	03/02/2006	24/03/2006	10/06/2006	127

* desde a primeira dose

§ Vivo até 10/10/2006, com recidiva local

• Vivo até 10/10/2006, com segundo tumor primario esofágico

	Pacientes que não receberam as três doses
	Resposta parcial-regressão tumoral
	Doença estável
	Progressão-aumento tumoral

Tabela 4

Um passo foi dado com a observação de que a vacina de DNA HSP65 do *Mycobacterium leprae* é segura para uso em pacientes com carcinoma epidermóide avançado do trato aéreo-digestivo alto. Pode-se também determinar que a aplicação de 3 doses de 400 µg como a dose máxima tolerável, possibilitando-se então a realização de ensaios fase II para melhor estudar sua ação.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. A injeção intratumoral de HSP-65 é factível e na dose de 400 mcg/injeção os eventos adversos foram considerados aceitáveis.
2. As medidas de volume tumoral evidenciaram resposta parcial 28,6% (4/14) e estabilização em 7,1% dos pacientes avaliáveis.
3. Com a metodologia utilizada não foi possível comprovar a transfecção e transcrição de DNA de HSP65.
4. Nos pacientes que apresentaram diminuição do volume tumoral parece ter havido benefício clínico.

Anexos

8. Anexos

Anexo 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE

.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº.....APTO:
.....
BAIRRO: CIDADE
.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
.....
BAIRRO: CIDADE:
.....
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Fase 1 do estudo da aplicação da vacina de DNA-HSP65

(Heat Shock Protein) do *Mycobacterium leprae* em pacientes com formas avançadas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

PESQUISADOR: Prof. Dr. Jorge Kalil

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52834

PESQUISADOR: Dr. Kald Abdallah

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 69793

PESQUISADOR: Dr. Pedro Michaluart Jr.

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alberto Ferraz.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 70236

UNIDADE DO HCFMUSP:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	X
RISCO MÉDIO		
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Com o objetivo de descobrir novos tratamentos para o câncer de cabeça e pescoço, o Corpo Clínico deste hospital está fazendo uma pesquisa clínica. Nesta pesquisa estamos desenvolvendo uma vacina para utilizar no tratamento do câncer e esta vacina parece ser capaz de estimular a resposta do sistema de defesa ou imune do próprio paciente contra o câncer.

Os experimentos com animais são encorajadores e sugerem que a vacina tenha um efeito contra o tumor. O estudo que estamos fazendo agora é um estudo que tem como objetivo a avaliação de riscos e de efeitos colaterais da vacina. O estudo será realizado com a injeção de três doses da vacina dentro do tumor em três diferentes datas com observação cuidadosa de cada paciente pelos médicos responsáveis pela pesquisa. Cada injeção consiste na aplicação de um a dois mililitros da vacina e produz desconforto semelhante a qualquer injeção intra-muscular (p.ex.: outras vacinas, medicamentos para dor). Após a injeção, os médicos observarão os pacientes do estudo por algumas semanas e o acompanhamento busca ver quais são os efeitos colaterais da vacina. Os experimentos com animais sugerem que haverá muito poucos efeitos colaterais e estes efeitos mais provavelmente são aumento da dor e inchaço no local do tumor. Todos os efeitos colaterais da vacina serão tratados com remédios e os médicos darão atendimento aos efeitos colaterais prontamente. A nossa esperança é que esta inflamação dentro do tumor cause uma diminuição ou parada do crescimento do tumor, entretanto faltam ainda muitos estudos para se definir isso com certeza.

Caso o Sr.(a) aceite participar do estudo o roteiro da pesquisa é o seguinte:

- no 1º dia o Sr.(a) será entrevistado, examinado e serão coletados amostras de sangue para exames de laboratório e receberá a 1ª injeção da vacina dentro do tumor.
- do segundo dia em diante, o Sr(a) será examinado e terá seu sangue coletado para exames. A avaliação diária do paciente pelo médico junto com os resultados de exames laboratoriais permitirá à equipe a identificação de qualquer efeito negativo desta vacina e o tratamento imediato.

- no 21º e 42º dia o Sr (a) receberá a 2ª e 3ª doses da vacina, respectivamente, e será acompanhado pelos médicos, além de ter seu sangue coletado para novos exames da mesma forma que na primeira injeção da vacina.

- no 49º dia o Sr (a) será avaliado por um Cirurgião da equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço que fará um procedimento de retirada de pequeno pedaço do tumor para avaliarmos os efeitos da vacina sobre o seu tumor. Esta biópsia é realizada com anestesia local, semelhante à anestesia dentária, produzindo pequena dor local no momento do procedimento e sem trazer outros riscos para sua saúde.

Estudos com vacinas semelhantes a estas em humanos não demonstraram reações graves em mais de 400 pacientes que já receberam tais vacinas. Esta vacina é uma vacina diferente das vacinas utilizadas comumente, pois se trata de um tipo novo de vacina. Estudos utilizando esta mesma vacina em animais de laboratório não demonstraram a ocorrência de efeitos colaterais graves. Nossa pesquisa é a primeira a avaliar os efeitos benéficos desta vacina em humanos e por isso contamos com toda a infra-estrutura deste Hospital, que está preparado para fornecer o suporte técnico necessário para o controle de eventuais efeitos colaterais.

Seu nome nunca será revelado e sua privacidade será respeitada. A identidade do Sr(a) não será revelada em caso de publicação dos dados levantados em literatura médica.

É importante ressaltar que se o Sr(a) não quiser participar deste estudo o Sr(a) não será punido e seu tratamento continuará normalmente.

O Sr(a) não é obrigado a participar e caso o Sr(a) concorde em participar desta pesquisa, não receberá nenhum pagamento por isso nem quaisquer benefícios ou direito financeiro a partir dos resultados do estudo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra Fanny Dantas de Lima

Divisão de Imunologia Clínica e Alergia HCFMUSP – Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 8º andar – Prédio dos Ambulatórios – bloco 03 — cep: 05403-010 - fone: 3069-6225

Dr Pedro Michaluart Jr.

Divisão de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. HCFMUSP – Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 8º andar – Hospital das Clínicas – sala 8014 – cep: 05403-010 - fone: 3069-6425

Dr Kald Ali Abdallah

Divisão de Imunologia Clínica e Alergia HCFMUSP – Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 8º andar – Prédio dos Ambulatórios – bloco 03 — cep: 05403-010 - fone: 3069-6225

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa
São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal
assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome
Legível)

Anexo 2

Cavidade Oral**TNM - Classificação Clínica****T - Tumor Primário**

TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4a	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos Profundos / extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face
T4b	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna

N - Linfonodos Regionais

NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão
N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão

M - Metástase à Distância

MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Grupamento por Estádios

Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II	T2 N0 M0
Estádio III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Estádio IVA	T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0
Estádio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estádio IVC	Qualquer T Qualquer N M1

Faringe**TNM - Classificação Clínica****T - Tumor Primário**

TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ

Orofaringe

T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4a	Tumor que invade qualquer das seguintes estruturas: laringe, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), pterigóide medial, palato duro e mandíbula
T4b	Tumor que invade qualquer das seguintes estruturas: músculo pterigóide lateral, lâminas pterigóides, nasofaringe lateral, base do crânio ou adjacentes a artéria carótida

Hipofaringe

T1	Tumor limitado a uma sub-localização anatômica da hipofaringe e com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor que invade mais de uma sub-localização anatômica da hipofaringe, ou uma localização anatômica adjacente, ou mede mais de 2 cm, porém não mais de 4 cm em sua maior dimensão, sem fixação da hemilaringe
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão, ou com fixação da hemilaringe
T4a	Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: cartilagem tireóide/cricóide, osso hióide, glândula tireóide, esôfago, compartimento central de partes moles*
T4b	Tumor que invade fáscia pré-vertebral, envolve artéria carótida ou invade estruturas mediastinais

Nota: *As partes moles do compartimento central incluem a alça muscular pré-laríngea (NT - omo-hioideo, esterno-hioideo, esterno-tireo-hioideo e tireohioideo) e gordura subcutânea.

N - Linfonodos Regionais (Oro- e Hipofaringe)

NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm, porém não mais de 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm até 6 cm em sua maior dimensão
N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
Nota:	Os linfonodos de linha média são considerados linfonodos homolaterais.

M - Metástase à Distância

MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Grupamento por Estádios (Orofaringe e Hipofaringe)

Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II	T2 N0 M0
Estádio III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Estádio IVA	T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0
Estádio IVB	T4b Qualquer N M0
Estádio IVC	Qualquer T N3 M0 Qualquer T Qualquer N M1

Laringe

T -Tumor Primário

TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>

Supraglote

T1	Tumor limitado a uma sub-localização anatômica da supraglote, com mobilidade normal da corda vocal
T2	Tumor que invade a mucosa de mais de uma sublocalização anatômica adjacente da supraglote ou a glote ou região externa à supraglote (p. ex., a mucosa da base da língua, a valécula, a parede medial do seio piriforme), sem fixação da laringe
T3	Tumor limitado à laringe com fixação da corda vocal e/ou invasão de qualquer uma das seguintes estruturas: área pós-cricóide, tecidos pré-epiglóticos, espaço para-glótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireóide (p. ex., córtex interna)
T4a	Tumor que invade toda a cartilagem tireóide e/ou estende-se aos tecidos além da laringe, p. ex., traquéia, partes moles do pescoço, incluindo músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), alça muscular, tireóide e esôfago
T4b	Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente a artéria carótida

Glote

T1	Tumor limitado à(s) corda(s) vocal(ais) (pode envolver a comissura anterior ou posterior), com mobilidade normal da(s) corda(s)
T1a	Tumor limitado a uma corda vocal
T1b	Tumor que envolve ambas as cordas vocais
T2	Tumor que se estende à supraglote e/ou subglote, e/ou com mobilidade diminuída da corda vocal
T3	Tumor limitado à laringe, com fixação da corda vocal e/ou que invade o espaço para-glótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireóide (p.ex., córtex interna)
T4a	Tumor que invade completamente a cartilagem tireóide, ou estende-se aos tecidos além da laringe, p.ex., traquéia, partes moles do pescoço, incluindo músculos os profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), alça muscular, tireóide e esôfago
T4b	Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente a artéria carótida

Subglote

T1	Tumor limitado à subglote
T2	Tumor que se estende à(s) corda(s) vocal(ais), com mobilidade normal ou reduzida
T3	Tumor limitado à laringe, com fixação da corda vocal
T4a	Tumor que invade a cartilagem cricóide ou tireóide e/ou estende-se a outros tecidos além da laringe, p. ex., traquéia, partes moles do pescoço, incluindo músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), tireóide e esôfago
T4b	Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente a artéria carótida

N - Linfonodos Regionais

NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm até 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm até 6 cm em sua maior dimensão
N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão

Nota: Os linfonodos de linha média são considerados linfonodos homolaterais.

M - Metástase à distância

MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Anexo 3 – ÍNDICE DE KARNOFSKY

Índice de Karnofsky	Critérios
100-90%	Paciente assintomático ou com sintomas mínimos
89-70%	Paciente sintomático, mas com capacidade para o atendimento ambulatorial
69-50%	Paciente permanece no leito menos da metade do dia
49-30%	Paciente permanece no leito mais da metade do dia
29-10%	Paciente acamado, necessitando de cuidados constantes
100-90%	Paciente assintomático ou com sintomas mínimos

Referências Bibliográficas

9. Referências Bibliográficas

1. STEWART BW, Kleinhues P. Head and neck cancer. **World cancer report**, IACR Press, Lyon, 2003, pp 232-236.
2. MS instituto Nacional de Câncer - **INCA Atlas de Mortalidade por câncer no Brasil:1979-1999**;25.
3. MS instituto Nacional de Câncer - **INCA Estimativa 2006 Índice geral de câncer**;39.
4. CHIN D, Boyle GM, Porceddu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. **Head and Neck Cancer: past, present and future**. Expert Review of Anticancer Therapy. 2006;6(7):1111-1118.
5. VADIYA AM, Petruzelli GJ, Clark J, Emami B. Patterns of recurrent head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaringol Head Neck Surg** 2001;125(4):393-396.
6. CANCER FACTS AND FIGURES – 2005 **American Cancer Society**, Atlanta, Georgia, 2005.
7. MAO L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on head and neck cancer. **Cancer Cell** 2004;5:311-316.
8. FORASTIERE A, Koch W, Totti A Sidransky D. Head and Neck Câncer. **N Engl J Med** 2001;345:1890-1900.
9. KOWALSKI LP. Results of salvage treatment of the neck in patients with oral cancer. **Arch Otolaringol Head Neck Surg**. 2002;128:58-62.
10. LOWRIE DB, Therapy for tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature** 1999;400:269-71
11. PARDOLL D M. Immune control in neoplasia. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 1999;21:

12. GRETTE TF, Jafee EM. Cancer Vaccines. **J. Clin. Oncol.** 1999;17(3):1047-1060.
13. FRANCO EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, Fava AS, Torloni H. Risk factors for oral câncer in Brazil: a case control study. **Int J Cancer** 1989;43(6):992-1000.
14. SCHLECHT NF, Franco EL, Pintos J, Negassa A, Kowlaski LP, Oliveira BV, Curado MP. Interaction between tobacco and alcohol consupntion and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. **Am J Epidemiol.** 1999;150(11):1129-1137.
15. GOLDEMBERG D, Lee J, Koch W M, Kim MM, Trink B Sidransky D, Moon C. Habitual risk factors for head and neck cancer. **Otolaringol Head Neck Surg** 2004;131-6:986-993.
16. SANKARANARAYANAN R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. **Anticancer Research** 1998;18(6B):4779-4786.
17. UICC - **TNM Classification of Malignant Tumours** - 6th ed. John Wiley & Sons, INC., Publication - 2002
18. VOKES E, Weischselbaum R R, Lippman S M, Hong W K. Medical progress: head and neck cancer. **N Engl J Med** 1993;328(3):184-194.
19. BOYLE J, Patel SG, Shah JP. Management of oral and oropharyngeal cancers. **Oral Diseases** 2003;9:109-111
20. PATEL S, Shah JP. Results of treatment in oral cancer. Shah J.P., Johnson N.W. and Batasakis J.G., Eds Martin Dunitz, pp.437-444.
21. MACHTAY M, Rosenthal DI, Hershock D, et al. Organ preservation therapy using induction plus concurrent chemoradiation for advanced resectable oropharyngeal carcinoma , a University of Pennsylvania Phase II trial. **J Clin Oncol** 2002;20:3964-3971.
22. DOMENGE C, Hill c, Lefebvre JL, et al. Randomized trial of neoadjuvant chemotherapy in oropharyngeal carcinoma. French Groupe Détude Des Tumeurs De La Tete Et Du Cou (GETTEC). **Br J Cancer** 2000;83:1594-1598.
23. THE DEPARTMENT OF VETERANSAFFAIRS LARYNGEAL CANCER STUDY GROUP: Induction chemotherapy plus radiation compared qith surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. **N Engl J Med** 1991;324:1685-1690

24. CONLEY B A. Treatment of advanced head and neck cancer: what lessons have we learned? **J Clin Oncology** 2006;24(7):1023-1025.
25. VERMORKEN JB Medical treatment in head and neck cancer. **Annals oncol** 2005;16:258-264
26. DREYFUSS AI, Clark JR, Norris CM, Rossi RM, Lucarini JW, Busse PM, Poulin MD, Thornhill L, Costello R, Posner MR, Docetaxel: an active drug for squamous cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Clinical Oncology** 1996;14(5):1672-1678.
27. KOTWALL C, Sako K, Razak M S, Rao U, Bakamjian V, Shedd DP. Metastatic patterns in squamous cell cancer of the head and neck. *Am. J. Surgery*. 1987;154:439-442
28. TAUSSKY D, Dulguerov P, Allal A S. Salvage surgery after radical accelerated radiotherapy with concomitant boost technique for head and neck carcinomas. **Head & Neck**.2005 27(3):182-6.
29. DE CREVOISIER R, Bourhis J, Domenge C, Wibault P, Koscielny S, Lusinchi A, Mamelle G, Janot F, Julieron M, Leridant AM, Marandas P, Armand JP, Schwaab G, Luboinski B, Eschwege F. Full-dose reirradiation for unresectable head and neck carcinoma: experience at the Gustave-Roussy Institute in a series of 169 patients. **Journal of Clinical Oncology**.1998;16:3556-3562.
30. OHIZUMI Y, Yamai Y, Imamiya S, et al. Prognostic factors of reirradiation for recurrent head and neck cancer. **Am J Clin Oncol**. 2002;25:408-413.
31. WONG SJ, Machtay M, Li Y. Locally recurrent, previously irradiated head and neck cancer: concurrent re-irradiation and chemotherapy, or chemotherapy alone? **Journal of Clinical Oncology**. 2006;24(17):2653-8,
32. HONG WK, BROMER R. Chemotherapy in head and neck cancer. *N Engl J Méd* 1983; 308:75-79.
33. AL SARRAF M. Head and neck cancer: chemotherapy concepts. **Semin Oncol** 1988; 15:70-85
34. CARVALHO A.L., Treatment results on advanced neck metastasis from head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2005;132:862-8.
35. KOWALSKI L P, Carvalho A L. Natural history of untreated head and neck cancer. **European j Cancer**. 2000;36(8):1032-1037.

36. ONGYANGO P, Genomics and cancer. **Curr Opin Oncol** 2002;14:75-89.
37. BURNET FM. Discussion on immunological tolerance. Concluding remarks. **Proc. R. Soc.** 1956;B 146, 90-92.
38. HOFFMANN TK, Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. **Clin Cancer Res** 2002;2: 2553-62.
39. PREHN RT, Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. **J.Ntl.Cancer Inst.** 1957; 18:769-94
40. LIN EY, Nguyen AV, Russel RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. **J Exp Med** 2001; 193:737-740.
41. WHITESIDE TL. Immunobiology of head and neck cancer. **Cancer and Methastasis reviews** 2005;24:95-105
42. IGNEY FH. Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews** 2002. 2(4):277-88
43. BERZOFSKI JA, Terabe M, Oh M, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik EJ, Morris JC. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. **J Clin Invest.** 2004;113(11):1515-1525.
44. COHEN EP. Cancer therapy with DNA-based vaccines. **Immunol. Letters** 2000;74:59-65.
45. TOLCHER AW, Hao D, Bono J, Miller A, Patnaik A, Hammond LA, Smetzer L, Hood JW, Rowinsky EK, Takimoto C, Hoff DV, Eckhardt SG. Phase I, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic study of intravenously administered Ad5CMV-p53 gene, in patients with advanced cancer. **J Clin Oncology** 2006;24(13):2052-2058.
46. GABRILOVICH DI, Nadaf S, Corak J, Berzofsky JA, Carbone DP. Dendritic cells in anti-tumor immune responses.II. Dendritic cells grown from bonemarrow precursors, but not mature DC from tumor- bearing mice are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. **Cell Immunol.** 1996;170:111-119.
47. LEE W T, Shimizu K, Kuriyama H, Tanaka H, Kjaergaard J, Shu S. Tumor dendritic cell fusion as a basis for cancer immunotherapy. **Otolaringol Head Neck Surg** 2005;132:755-764.
48. SIDERS WM, Vergilis KL, Johnson C, Shields J, Kaplan JM. Induction of specific anti-tumor immunity in the mouse with the

electrofusion product of tumor cells and dendritic cells. **Mol. Ther.** 2003;7:498-505.

49. NAIR SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. **Int. J. Cancer** 1997;70:706-715.

50. PAGLIA P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. **J. Exp. Med.** 1996;183:317-322.

51. GLEICH LL. Gene therapy for head and neck cancer. **Laryngoscope** 2000;110(5 Pt 1):708-26.

52. COUCH M, Saunders J K, O'Malley B W, Pardoll D, Jaffee E. Genetically engineered tumor cell vaccine in a head and neck cancer model. **Laryngoscope** 2003;113:552-556.

53. WYATT C, Wood B G, Krauss J C, Strome M, Esclamado R M, Lavertu P, Dasko D, Kim J A, Plautz G E, Leff B E, Smith V, Sandstrom-Wakeling K, Shu S. Systemic adoptive T-cell immunotherapy in recurrent and metastatic carcinoma of head and neck: a phase I study. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2000;126:1225-1231.

54. LAI WC, Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. **J. Immunol** 1997;158:808-09.

55. TASCONE RE, Vaccination against tuberculosis by DNA injection. **Nature Medicine** 1996;888-92.

56. HUYGEN K, Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. **Nature Medicine** 1996;893-98.

57. ROSEMBERG AS et al Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. **Nat Med.** 1998;4:321-327.

58. GELUK A, Elferink DG, Sleirendregt BL, Meijgaarden KEV, Vries RRD, Ottenhoff TH, Bontrop RE. Evolutionary conservation of major histocompatibility complex-DR/peptide/Tcell interactions in primates. **J. Exp. Med.** 1993;177:979-987.

59. SOUSA AO, Salem JI, Lee FK, Verçosa MC, Cruaud P, Bloom BR, Lagrange PH, David HL. Na epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis,

the YanomaMi indians of the brazilian amazon. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:13227-13232.

60. ABRAHAM J, Allegra CJ. **Handbook of clinical oncology** 2001. 1st edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

61. ROSEMBERG SA. **Biologic therapy of cancer** 2000, 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

62. RITOSSA F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia** 1962;18:571-573.

63. HARTL FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded proteins. *Science* 2002;295:1852-1858.

64. LINDQUIST S, Craig E A. The heat shock proteins. **Annu. Rev. Genet.** 1988;22:631-677.

65. FINK AL. Chaperone-mediated protein folding. **Physiol. Rev.** 1999;79:425-449.

66. JOLLY c, Morimoto R I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenes and cell death. **J. Ntl Cancer Inst.** 2000;92:1564-1572.

67. GETHING M J Sambrook J. Protein folding in the cell. **Nature** 1992 355(6355):33-45.

68. NETZER W J, Hartl FU. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. **Trends in Biochem Sci.** 1998 23(2):68-73.

69. BECKMANN R P, Mizzen L E, Welch W J. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. **Science**. 1990;248(4957):850-4.

70. MULTHOFF G, Botzler C, Weisnet M, Meier T, Wilmanns W, et al. A stress-inducible 72kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. **Int J Cancer** 1992;61:272-279.

71. SUZUE K, Young R ^a Heat shock protein as immunological carriers and vaccines.196 **EXS**;77:451-465.

72. RICO A I, Angel S O, Alonso C, Requena J M. Immunostimulatory properties of the Leishmania infantum heat shock proteins HSP70 and HSP83. **Molecular Immunology**. 1999;36(17):1131-9,

73. QAZI KR, Qazi MR, Julian E, Singh M, Abedi-Valugerdi M, Fernandez C. Exposure to mycobacteria primes the immune system for evolutionarily diverse heat shock proteins. **Infection & Immunity**. 2005;73(11):7687-96, Nov.
74. TOES REM, Ossendorf F, Offringa R, Melief CJM. CD4+ cells and their role in antitumor immune response. **J Exp. Med**. 1999;189:753-756.
75. BANCHEREAU J, Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** 1998;392:245-252.
76. BENCHEREAU J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, Palucka C. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Of Immunol** 2000;18:767-811.
77. LOTZE MT, Thomson AW. **Dendritic cells. Biology and clinical applications**. Academic Press, 1999.
78. PARDOLL DM. Inducing autoimmunity disease to treat cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1999;96:5340-5342.
79. LOWRIE DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. **Vaccine** 1997;15(8):834-838.
80. SCHUHBAUER DMS, Mitchison NA, Mueller B. Interaction within clusters of dendritic cells and helper T cells during initial Th1/Th2 commitment. **European Journal of Immunology** 2000;30(5):1255-1262.
81. AKBARI O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B. DNA Vaccination and activation of dendritic cells as key events for immunity. **J Exp Med** 1999;189-1:169-177.
82. LUKACS KV, Lowrie DB, Stokes RW, Colston MJ. Tumor cells transfected with a bacterial heat-shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors. **J. Exp. Med** 1993 Jul 1; 178(1):343-348.
83. LUKACS KV, Nakakes A, Atkins CJ, Lowrie DB, Colston MJ. In vivo gene therapy of malignant tumors with heat shock protein-65. **Gene Ther**. 1997 Apr;4(4):346-350.
84. LUKACS KV, Pardo OJ, Colston MJ, Geddes DM, Alton EFWF. **Heat shock proteins in cancer therapy in Cancer Gene Therapy: past achievements and future challenges**. Habib Kluwer Academic/ Plenum publishers, 2000, New York.

85. WHITE AS, Conry RM. Cancer Vaccines: Clinical applications (pg 679) in Rosemberg SA. **Biologic Therapy of Cancer** 2000. 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
86. FAULDS G, Conroy S, Madaio M, Isemberg D, Latchman. Increased levels of antibodies to heat shock proteins with increasing age in MRL/MP-LPR-LPR mice. **Brit . J. Reumatol** 1995;34:610-615.
87. RAGNO S, Colston M J, Lowrie D B, Winrow V R, Blake D R, Tascon R. Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65. **Am College Reumatol** 1997;40(2):277-283.
88. SANTOS-JUNIOR RR, Sartori A, De Franco M, Filho OG, Coelho-Castelo A A, Bonato V L, Cabrera W H, Ibanez O M, Silva C L. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. **Human Gene Therapy**.2005;16(11):1338-45.
89. ILANGUMARAN S. Shankernarayan N. Ramu G. Muthukkaruppan V. Antibody response to recombinant 65-kDa, 70-kDa and 18-kDa mycobacterial antigens in leprosy patients and healthy contacts in a leprosy-endemic population. **Journal of Leprosy & Other Mycobacterial Diseases**. 1994.62(2):245-55.
90. CLAYMAN GL, Johnson CJ, Morrison W, et al. The role of neck dissection after chemoradiotherapy for oropharyngeal cancer with advanced nodal disease. **Arch. Otol Head Neck Surg** 2001;127:135-9.
91. NARAYAN K, Crane CH, Kleiden S, et al. Planned neck dissection as an adjunct to the management of patients with advanced neck disease treated with definitive radiotherapy: for some or for all? **Head Neck** 1999;21:606-613.
92. RICHARDS BL, Spiro JD. Controlling advanced neck disease: efficacy of neck dissection and radiotherapy. **Laryngoscope** 2000;110:1124-1127.
93. ROSNER, B **FUNDAMENTALS OF BIOSTATISTICS**, Duxbury Press, 4^a edição New York, 1994, pp. 682.
94. CARVALHO AL, Pintos J, Schlecht MS, Oliveira BV, Fava AS, Curado MP, Kowalski LP, Franco EL. Predictive factors for diagnosis of advanced stage squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2002;128:313-318.
95. COLEVAS AD. Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of th head and neck. **J Clin Oncol** 2006;24(17):2644-2652.

96. JACOBS C , Lyman G, Velez-Garcia E, et al. A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol** 1992;10:257-263.
97. SCHOFFSKI P, Catimel G, Planting A S,et al. Docetaxel and cisplatin: an active regimen in patients with advanced, recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. Results of a phase II study of the EORTC Early Clinical Studies Group. **Ann Oncol** 1999;10:199-122.
98. SPECHT L, Larsen sk, Hansen HS. Phase II study of docetaxel and cisplatin in patients with recurrrent or disseminated squamous-cell carcinoma of the head and neck. **Ann Oncol** 1999;11:845-849.
99. GLISSON BS, Murphy BA, Frenette G, Khuri FR, Forastiere AA Phase II trial of docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol** 2002;20:1593-1599.