Milena Perez Mak

Avaliação da eficácia de ácido valproico combinado ao tratamento padrão de quimiorradioterapia concomitante baseada em cisplatina, em pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço localmente avançado

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Castro Junior

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mak, Milena Perez

Avaliação da eficácia de ácido valproico
combinado ao tratamento padrão de
quimiorradioterapia concomitante baseada em
cisplatina, em pacientes portadores de carcinoma
epidermoide de cabeça e pescoço localmente avançado /
Milena Perez Mak. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: Gilberto de Castro Junior.

Descritores: 1.Neoplasias de cabeça e pescoço
2.Regulação epigenética 3.Ácido valproico 4.Estudo
de fase II 5.microRNAs 6.Quimiorradioterapia

USP/FM/DBD-283/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, colega, amigo e coautor, Tiago Kenji Takahashi e às nossas filhas, Estela e Alana, que ofereceram seu apoio incondicional ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, John e Doraci, pelo constante incentivo e estímulo à busca da excelência acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Castro Junior, orientador, conselheiro, exemplar profissional e alma da vida acadêmica. Sou agradecida pelo constante aprendizado e confiança no desenvolvimento deste estudo.

À Dra. Fatima Solange Pasini, fundamental para a translação deste estudo clínico. Agradeço imensamente o grande aprendizado durante todos esses anos.

Ao Dr. Igor Moysés Longo Snitcovsky, pela concepção, auxílio no desenho do protocolo e oportunidade de executar este estudo.

Aos colegas do grupo azul, em especial à Dra. Renata Eiras e Dr. Denyei Nakazato que participaram do atendimento aos pacientes do estudo.

À Fabyane Garcia Oliveira Teixeira, por toda ajuda na coleta e processamento das amostras e auxílio nas análises de microRNAs.

Ao Alex Vieira Amadio, por sua ativa participação nas análises de acetilação de histonas e biomarcadores no tecido.

À Dra. Sheila Aparecida Siqueira, pelo apoio da anatomia patológica.

À equipe da radioterapia, em especial à Dra. Cristiane Maria Almeida, pela atenção e disponibilidade dos pacientes deste protocolo.

Ao Departamento de Radiologia e Oncologia pelo apoio para desenvolvimento deste trabalho.

À equipe da pesquisa clínica, pelo apoio logístico e administrativo, durante a implantação e execução do estudo.

Aos colegas do departamento de bioinformática da Universidade do Texas, MD Anderson Cancer Center, Dr. Jing Wang e Lixia Diao pelas análises de perfis de microRNAs.

À Profa. Dra. Laura Sichero e seu laboratório, pela realização da pesquisa de HPV nas amostras tumorais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho.

Aos pacientes e seus familiares, pela confiança e participação neste estudo.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. Mecanismo de ação antitumoral dos inibidores da deacetilação das histonas	3
1.2. O uso de ácido valproico como iHDAC no tratamento de neoplasias	4
1.3. Uso de iHDACs em CECp	8
1.4. Papel de iHDACs em tumores HPV relacionados	9
1.5. O uso de biomarcadores de atividade de iHDACs	10
1.6. Delineamento do estudo	12
2. Objetivos.....	13
2.1. Objetivo Primário.....	14
2.2. Objetivos Secundários	14
2.3. Objetivos Exploratórios	14
3. Métodos	15
3.1. Tipo de estudo.....	16
3.2. População do estudo: Critérios de elegibilidade	16
3.3 Critérios de exclusão	17
3.4. Tratamentos e procedimentos	18
3.4.1. Inclusão no estudo.....	18
3.4.2.Tratamento.....	18
3.4.3. Avaliação durante e após tratamento.....	20
3.4.4. Interrupções de tratamento e ajuste de doses.....	21
3.4.5. Avaliação de resposta.....	22
3.5. Considerações estatísticas	22
4. Análises exploratórias	24
4.1. Determinação do grau de acetilação de histonas H3 e H4 em células mononucleares de sangue periférico e determinação da expressão de micrornas	25
4.1.1. Metodologia para determinação da acetilação de histonas.....	25
4.1.1.1. Processamento sangue periférico.....	25

4.1.1.2.	Determinação da acetilação de histonas em mononucleares de sangue periférico.....	26
4.1.1.3.	Determinação da concentração de proteína total	26
4.1.1.4.	Determinação da acetilação das histonas H3 e H4.....	27
4.2.	Metodologia para determinação da expressão de microRNAs	28
4.2.1.	Coleta de saliva.....	28
4.2.1.2.	Extração de RNA total.....	28
4.2.1.3.	Transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase quantitativo (RT-qPCR) com o sistema <i>Taqman microRNA assay-array</i> no plasma.....	29
4.2.1.4.	Análise dos dados de perfis de microRNAs.....	30
4.2.1.5.	Validação dos microRNAs de interesse por RT-qPCR.....	31
4.2.1.6.	Ensaio funcionais com exossomos.....	32
4.3.	Expressão imuno-histoquímica de HR23B e HDAC2.....	34
4.4.	Determinação do status HPV	35
5.	Resultados	37
5.1.	Desfechos clínicos	38
5.2.	Avaliação de qualidade de vida	42
5.3.	Resultados exploratórios	43
5.3.1.	Avaliação imuno-histoquímica da expressão de HDAC2 e HR23B.....	43
5.3.2.	Avaliação de acetilação de histonas em monócitos periféricos.....	45
5.3.3.	Avaliação do perfil de microRNAs.....	46
5.3.4.	Validação de microRNAs em plasma.....	52
5.3.5.	Validação de microRNAs em saliva.....	57
5.3.6.	Ensaio funcionais com exossomos.....	59
6.	Discussão	62
7.	Conclusões	66
8.	Anexos	68
9.	Referências	85

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromol

5 AZA – 5-Azacitidina

5-FU – 5-fluorouracil

AEM – Alteração de estado mental

ATRA – ácido transretinoico

AUC - área sob a curva

BUM – mistura beta-uniforme

C - Celsius

CDKs - quinases dependentes de ciclinas

CECP – Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço

C-FLIP - *caspase-like apoptosis regulatory protein*

Ct - *cycle threshold*

DE – doença estável

DMEM - Dulbecco's modified Eagle

DTIC – dacarbazina

ECOG - *Eastern Cooperative Oncology Group*

EDTA - ácido etilendiaminotetracético

EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico

EORTC - *European Organization for the Research and Treatment of Cancer*

FC - Fold change

FDR - false discovery rate

FEC - 5FU, Epirrubicina e ciclofosfamida

g - grama

GBM – Glioblastoma multiforme

Gy – Gray

h - hora

HDCAs - deacetilases de histonas

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HPV – papiloma vírus humano

HR – *hazard ratio*

Icesp - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

IC50 - concentração inibitória para 50% das células

iHDAC - inibidor da deacetilação das histonas

INF – interferon alfa

kg - quilograma

LA – Localmente avançado

LMA – leucemia mieloide aguda

MeV - mega eletróns-volt

miR – MicroRNA

mL – mililitros

mM - milimol

MTT - atividade metabólica por formação de cristais de formazam

MV - mega-volts

N - número de pacientes

NCI CTCAE - *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria for Adverse Events*

NF – Neutropenia febril

NS – nível sérico

PBMC - células monocíticas periféricas

PBS - *phosphate buffered saline*

PDZ - Psd-95 (proteína de densidade pós-sináptica), DlgA (supressor tumoral de disco largo de drosófila) e ZO1 (Proteína Zonula Occludens-1)

pRb - proteína do retinoblastoma

QLQ-C30 – *Questionnaire developed to assess the quality of life of cancer patients*

QLQ-HN35 - *Questionnaire developed to assess the quality of life of head and neck cancer patients*

qPCR – *Polymerase chain reaction quantitative real time*

QRT – quimiorradioterapia

RC – resposta completa

RECIST - *Response evaluation criteria in solid tumors*

ROC - característica de operação do receptor

RP – resposta parcial

rpm - rotações por minuto

RT – radioterapia

SFB - soro fetal bovino

SMD – Síndrome mielodisplásica

TLDA - TaqMan® Low Density Array

TNE – tumor neuroendócrino

TNF α - *tumor necrosis factor alpha*

TR – taxa de resposta

TRAIL - *tumor necrosis factor superfamily member 10*

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

VO – via oral

VPA - Ácido valproico

VS- voluntários sadios

β -HCG - gonadotrofina coriônica humana

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática do tratamento e avaliação de biomarcadores	20
Figura 2: Diagrama consorte da inclusão de pacientes no estudo. Um paciente foi retirado do estudo por perda de <i>performance status</i>	38
Figura 3: Variação de escore de qualidade de vida geral entre o status basal (antes do início do tratamento) e no momento de avaliação de resposta (6-8 semanas do término da quimiorradioterapia associada a VPA)	43
Figura 4: Escalas de expressão imuno-histoquímica de HDAC2 e HR23b. Nas diferentes figuras (A-F) são apresentados exemplos da intensidade de expressão imuno-histoquímica de HDAC2 (A-C) e HR23b (D-F) em ordem crescente. Classificações 1+ (A e D), 2+ (B e E) e 3+ (C e F) podem ser visualizadas ao longo dos painéis. Aumento de 200 vezes	44
Figura 5: Correlação da imunoexpressão de HDAC2 com prognóstico. Análise por curva ROC da correlação da expressão de HDAC2 avaliado por escore H. Valores acima de 170 foram correlacionados a sobrevida livre de doença em 6 meses com sensibilidade de 83% e especificidade de 100%	45
Figura 6: Análise BUM da comparação da expressão de miRs entre os pacientes pré-tratamento e controles sadios	48
Figura 7: Representação gráfica através de <i>heatmap</i> (mapa de calor) de análise de cluster hierárquico da expressão de miRs selecionados segundo menores valores de p (n=43, correlação por Pearson) de pacientes (colunas, barra superior cinza) e controles sadios (colunas, barra superior preta)	49
Figura 8: Níveis de expressão de miRs entre pacientes pré-tratamento (P0) e controles sadios. Comparação entre grupos através de teste t	50
Figura 9: Representação gráfica através de <i>heatmap</i> (mapa de calor) de análise de cluster hierárquico da expressão de miRs (correlação por Pearson) de respondedores (colunas, barra inferior preta) e não respondedores (colunas, barra inferior cinza).	52
Figura 10: Teste t comparando a expressão de miR-let-7e e miR-let-7a em controles e pacientes ao início do tratamento através da avaliação do perfil de miRs em plasma por TLDA.	59
Figura 11: Ensaio MTT em linhagens celulares de cabeça e pescoço. Concentrações crescentes de cisplatina foram testadas para determinação da dose de IC50. As linhagens SCC-4 e SCC-25 apresentaram uma viabilidade em torno de 60% com a dose de 20 µM em 24 horas de tratamento e a linhagem SCC-9, 52% de viabilidade com a dose de 50 µM, por 48 horas de tratamento. Foram realizados 3 ensaios independentes, em triplicata, para SCC-24 e para as demais, 2 ensaios. Os dados estão expressos em porcentagem em relação à célula controle, ou seja, a que não recebeu cisplatina	60
Figura 12: Ensaio MTT em linhagens celulares de cabeça e pescoço. O acréscimo de exossomos não teve impacto significativo na citotoxicidade à cisplatina avaliada com 24h de tratamento em ensaios independentes, para linhagens SCC-4, SCC-9 e SCC-25. CTR: controle; VS: voluntário sadio; P0-R: paciente pré-tratamento respondedor; P0-NR: paciente pré-tratamento não respondedor	60

Figura 13: Avaliação de migração celular ao longo do tempo. Para a linhagem celular SCC-9 observou-se um incremento na taxa de migração celular com o acréscimo de exossomos derivados de pacientes não respondedores após duas semanas de ácido valproico (P1-NR) em comparação ao controle (sem acréscimo de exossomos). Teste-t, $p<0.001$. As linhas contínuas representam o grupo não respondedor e as linhas tracejadas os respondedores. As demais diferenças observadas não apresentaram significância estatística 61

Lista de tabelas

Tabela 1: Estudos fase I de VPA	6
Tabela 2: Estudos fase I/II e fase II	7
Tabela 3: Características dos pacientes	39
Tabela 4: Características dos tratamentos dos pacientes	40
Tabela 5: Toxicidades associadas ao tratamento	41
Tabela 6: Avaliação de resposta	42
Tabela 7: Concentração de histonas H3 e H4 acetilada (ng/mg de proteína, células mononucleares periféricas) antes (P0) e após o tratamento com VPA (P1) (n=10). “indetectável” refere-se à quantidade de indetectáveis ao método utilizado.	46
Tabela 8: Características clínicas dos voluntários sadios	47
Tabela 9: Principais alvos validados relacionados a carcinogênese de miRs desregulados em pacientes com CECp	50
Tabela 10: Níveis de expressão medianos de miRs diferencialmente expressos entre respondedores e não respondedores	51
Tabela 11: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo	53
Tabela 12: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo	54
Tabela 13: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo	55
Tabela 14: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo	56
Tabela 15: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo	57
Tabela 16: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em saliva, de acordo com cada um dos grupos de estudo	58
Tabela 17: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em saliva, de acordo com cada um dos grupos de estudo	58

RESUMO

Mak MP. *Avaliação da eficácia de ácido valproico combinado ao tratamento padrão de quimiorradioterapia concomitante baseada em cisplatina, em pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço localmente avançado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: O tratamento padrão do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) localmente avançados (LA) irresssecável é a quimiorradioterapia (QRT) baseada em cisplatina. O ácido valproico (VPA) atua como regulador epigenético através da inibição da deacetilação das histonas e apresenta ação radiosensibilizante *in vitro*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da associação de VPA a QRT e biomarcadores associados em pacientes portadores de CECP-LA candidatos à quimiorradioterapia baseada em cisplatina. **Materiais e métodos:** Estudo de fase II segundo desenho de Simon para avaliação da taxa de reposta (TR) radiológica após 8 semanas do término da QRT combinada ao VPA (P3). Coletou-se amostras para avaliação de perfil de microRNAs (saliva e plasma) pré-tratamento (P0), após 2 semanas de VPA (P1) e em P3, e acetilação de histonas (plasma) em P0, P1 e no término da QRT com VPA (P2). A expressão imuno-histoquímica de p16, HDAC2 e HR23B foi avaliada nos tumores. Os microRNAs (miRs) escolhidos a partir do perfil em plasma, foram validados por qPCR na saliva e estudos funcionais com vesículas extracelulares foram conduzidos. **Resultados:** Dez pacientes masculinos, tabagistas atuais ou passados, idade mediana de 55 anos (41-65) com tumores de orofaringe irresssecáveis (p16 negativos) foram incluídos e tratados. O recrutamento foi suspenso devido a toxicidade excessiva. Em nove pacientes avaliáveis observou-se uma TR de 88%. Um escore H superior a 170 de expressão de HDAC2 apresentou 90% de acurácia em prever a sobrevida livre de doença em 6 meses. Pacientes e voluntários sadios apresentaram perfis de microRNAs (miRs) distintos, com 169 miRs diferencialmente expressos, considerando *false discovery rate* de 5%. miRs supressores tumorais como miR-31, -222, -let-7a/b/e e -145 encontravam-se hipoexpressos em pacientes em comparação a voluntários sadios. Menores níveis de miR-let-7a/e em pacientes comparados a voluntários sadios foram validados em saliva com qPCR. Houve aumento da migração celular com acréscimo de vesículas extracelulares de pacientes não respondedores em comparação ao controle. **Conclusões:** A combinação de VPA a QRT mostrou sinais de eficácia, porém com toxicidades limitantes. Caracterizou-se um distinto padrão de expressão de miRs entre pacientes e voluntários sadios, sendo validados menores níveis de miR-let-7a/e em saliva.

Descritores: Neoplasias de cabeça e pescoço; Regulação epigenética; Ácido valproico; Estudo de fase II; microRNAs; Quimiorradioterapia.

ABSTRACT

Mak MP. *Phase II trial of valproic acid combined with cisplatin-based chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (LAHNSCC) patients (pts)* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Background: Although cisplatin-based chemoradiation (CRT) offers LA HNSCC pts a high local control rate, relapses are frequent. Our goal was to evaluate whether valproic acid (VA), a histone deacetylase inhibitor (HDACi), combined with CRT in LA HNSCC improved response rate (RR) and associated biomarkers. **Methods:** This phase II trial included patients with unresectable oropharynx (OP) and oral cavity LA HNSCC. CRT begun after two weeks of VA (P1). RR at 8 weeks after CRT+VA (P2) by response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) version 1.1. was our primary goal. Biomarkers included microRNA (miR) PCR-array profiling in plasma samples at baseline, P1 and P2, which were compared to healthy controls by two-sample t-test for each miR. Distribution of the p-values was analyzed by beta-uniform mixture. Findings were validated by real-time polymerase chain reaction (qPCR) for selected miRs in plasma and saliva. Functional extracellular vesicles (EV) assays were performed in head and neck cell lines (SCC9 and SCC25). p16, HDAC2 and HR23B tumor immunohistochemistry were also evaluated. **Results:** We included 10 LA p16 negative OP pts. Median age was 55 years (41-65). All pts were male, smokers/ex-smokers and with previous moderate/high alcohol intake. Due to significant toxicities, accrual was terminated. In nine evaluable patients, a RR of 88% was observed. miR plasma profiling revealed differential expression of 169 miRs between pts and controls (FDR 0.05), including lower expression of known tumor suppressors (TS) such as miR-31, -222, -let-7a/b/e and -145. There were no significant differences in miR expression at P1 versus baseline. P2 compared to baseline had lower levels of miR-31, in particular in responders (p 0.007). miR-let-7a/e lower expression in pts compared to healthy volunteers (HV) was validated in saliva qPCR. EVs from HV, baseline responders and non-responders and pts at P2 did not alter cell lines sensitivity to cisplatin, however increased migration. A HDAC2 H-score above 170 was 90% accurate in predicting six-month disease-free survival. **Conclusions:** VA+CRT improved RR compared to our historical control; however, at the cost of prohibitive toxicities, which prevented the trial from continuing. Pts and HV had a markedly different pattern of miR expression, mainly with low levels of TS targeting TP53. miR-let-7a/e levels were lower in pts compared to healthy controls, reinforcing the aggressive nature of such tumors.

Descriptors: Head and neck neoplasms; Epigenetics; Valproic acid; Phase II trial; MicroRNAs; Chemoradiotherapy.

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) é, segundo dados mundiais, a oitava neoplasia mais frequente, correspondendo a cerca de 700 mil casos novos ao ano.¹ A patogênese da doença deve-se a fatores distintos, sendo a maioria dos casos relacionados a álcool e tabaco. Outro fator causal conhecido é o papilomavírus humano (HPV), notadamente o HPV 16, correspondendo a 13 a 56% dos casos de cânceres de orofaringe a depender da região geográfica.² Até o presente momento não há recomendações específicas quanto a tratamentos diferenciados por subtipo (HPV relacionado ou não), apesar do melhor prognóstico associado a tumores de orofaringe relacionados ao HPV.³ A maioria dos casos, cerca de 70%, é diagnosticada em estádios localmente avançados (III a IVB).⁴ Em pacientes portadores de tumores irresssecáveis o tratamento padrão consiste em quimiorradioterapia concomitante (QRT) baseada em cisplatina, alcançando ganho absoluto de 8% em sobrevida global quando comparado a radioterapia isolada.⁵

Todavia, mesmo em pacientes submetidos a tal terapêutica, observa-se que, em cinco anos, 66,3% dos pacientes apresentam falha local, a distância ou óbito.⁵ Algumas estratégias para melhorar a eficácia do tratamento foram estudadas. A intensificação da quimioterapia associada a radioterapia, com o acréscimo de taxanos ao tratamento de indução com cisplatina e 5-fluorouracil (5FU) infusional, levou a ganho em sobrevida global estatisticamente significativo. No estudo TAX 323 com pacientes com doença irresssecável seguido de radioterapia isolada o ganho foi de 14,2 para 18,6 meses.⁶ Já em estudo publicado no mesmo ano (TAX 324) em pacientes com doença localmente avançada independentemente de sua ressecabilidade e tratamento sequencial com radioterapia associada à carboplatina houve aumento de sobrevida global de 34,8 para 70,6 meses.⁷ Porém, não houve nestes estudos comparação ao esquema de indução ao tratamento padrão de quimiorradioterapia baseado em cisplatina. Posteriormente, outros estudos tentaram avaliar a superioridade da quimioterapia de indução com esquema docetaxel, cisplatina e 5FU sobre a quimiorradioterapia padrão. Contudo, dado o baixo recrutamento, estes estudos foram interrompidos, sem demonstrar superioridade desta estratégia.^{8,9}

Outra estratégia é o uso de agentes biológicos. Sabe-se que em CECP há hiperexpressão do receptor do fator de crescimento epidermoide (EGFR). Vermorken et al.¹⁰ estudaram a associação de cetuximabe (anticorpo monoclonal anti-EGFR) à terapia paliativa com platina e 5FU infusional para pacientes com CECP metastático ou recidivado. Houve um aumento em sobrevida global de 7,4 para 10,1 meses (*hazard ratio* (HR) 0,80, IC 95% 0,64 a 0,99; $p=0,04$), mostrando-se uma estratégia promissora, confirmada também no tratamento primário da

doença localmente avançada. Bonner et al.¹¹ aleatorizaram 415 pacientes para tratamento de radioterapia isolada ou radioterapia com cetuximabe, com ganho significativo em sobrevida global de 29,3 para 49 meses (HR 0,73, IC 95% 0,56 a 0,95; $p=0,018$).

Um outro fator a ser considerado também são formas de aumento de eficácia da radioterapia, como esquemas hiperfracionados ou acelerados. Em meta-análise de 6515 pacientes individuais pode-se observar ganho em sobrevida global de 3,4% em cinco anos em pacientes tratados com regimes de fracionamento alternativos.¹² Contudo, a melhor forma de incorporar tal estratégia ao tratamento padrão não é atualmente conhecida.

Um ponto importante a ser considerado é que a implantação destas novas estratégias elevam o custo significativamente. Desta forma, cria-se uma barreira de acesso a tais tratamentos ao usuário do Sistema Único de Saúde; tanto pelo custo de drogas biológicas em si, como pela dificuldade de realizar medicação infusional e pela alta demanda por radioterapia e limitada disponibilidade desta modalidade de tratamento. Sendo assim, impõe-se a necessidade de novas formas de tratamento que possam aumentar a eficácia do tratamento padrão, sem acarretar em custo proibitivo a sua incorporação em cenários de recursos escassos.

1.1. MECANISMO DE AÇÃO ANTITUMORAL DOS INIBIDORES DA DEACETILAÇÃO DAS HISTONAS

O ácido valproico (VPA) é um inibidor da deacetilação das histonas (iHDAC) de classe I, ou seja, inibe as deacetilases de 1 a 3, acessível e já em uso na prática clínica como anticonvulsivante e estabilizador do humor. Assim como outros iHDACs, seu uso vem sendo estudado em uma série de neoplasias sólidas e hematológicas. Estes compostos afetam a estrutura da cromatina que está envolvida na regulação epigenética de expressão gênica, embora o mecanismo molecular exato do efeito antitumoral seja desconhecido. As deacetilases de histonas (HDACs) levam à condensação da cromatina e repressão à transcrição. Sendo assim, a inibição da deacetilação de histonas tem atividade anticâncer através de ativação de vias de apoptose e diferenciação celular com interrupção de ciclo celular em G1/S mediada pela proteína do retinoblastoma (pRb). Há também diminuição de expressão de fatores de crescimento, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblasto, fator induzido por hipóxia-1, entre outros. Os iHDACs também podem regular a atividade de p53 mutado e selvagem, levando a uma resposta pró-apoptótica.¹³ Em culturas de células demonstrou-se efeito radiosensibilizante de iHDACs através da parada de células em G0/G1 ou G2/M, o que confere maior sensibilidade ao dano da radiação ionizante.¹⁴⁻¹⁶ Em estudo com cultura de células de câncer de ovário pode-se observar ação sinérgica de VPA em

dose terapêutica à cisplatina, inclusive em células com resistência a platina.¹⁷ Esta atividade biológica de iHDACs pode ser avaliada pela acetilação em células monocíticas periféricas (PBMC).

A ação do VPA na regulação epigenética se dá pela hiperacetilação de porção N-terminal de histonas H3 e H4 *in vitro* e *in vivo*, com inibição enzimática direta de HDAC com concentração de 0,5 mM.¹⁸ Sua ação radiosensibilizante pode se estender até 24h após o tratamento, tendo aplicabilidade clínica direta.¹⁹ Evidências *in vitro* demonstraram que algumas populações de células de CECP têm seu crescimento inibido por VPA e que independentemente desta ocorrência há acetilação de histona H3 correlacionada a aumento de expressão de p21. Tal efeito não é relacionado à expressão de p53.²⁰

A atividade anticâncer de iHDAC está sendo testada em vários tumores sólidos e neoplasias hematológicas, em estudos clínicos em andamento, já existindo aprovação nos Estados Unidos de dois agentes desta classe (vorinostat e romidepsin) para uso de rotina em linfoma T cutâneo e o panobinostat para tratamento de mieloma múltiplo.^{21,22}

A combinação desses agentes a radioterapia tem-se mostrado segura e promissora. Ree et al. publicaram estudo de fase I de vorinostat em pacientes com câncer colorretal submetidos a radioterapia paliativa, sem relatos de aumento de toxicidade.²³ Além disso, há evidência *in vivo* do uso tópico de iHDACs (fenilbutirato, tricotatina A e VPA) como fator protetor à radiodermite em tecidos sadios, fibrose cutânea induzida por radioterapia e tumores cutâneos secundários.²⁴ O uso de VPA em combinação a radioterapia também está sendo estudado (NCT00879437).^{25,26} Em um estudo de fase II por Krauze et al.²⁷ a combinação de VPA, temozolomida e radioterapia apresentou perfil de toxicidade aceitável, com 32% de toxicidade medular e sobrevida global superior a dados históricos (sobrevida global em 1 ano de 86% versus 55% controle histórico).

1.2. O USO DE ÁCIDO VALPROICO COMO IHDAC NO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS

O ácido valproico (VPA) é um anticonvulsivante com rápida absorção oral, com pico de concentração sérica em aproximadamente 1-4h. É uma medicação acessível, bem tolerada e de longo tempo em uso na prática clínica e, portanto, com efeitos colaterais já conhecidos. Apresenta uma grande ligação a proteínas plasmáticas e a concentração plasmática para níveis terapêuticos é de 40 a 100 µg/mL. Em estudos aleatorizados os efeitos adversos mais comuns foram reações gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia) e sintomas neurológicos como

sonolência, tremor e vertigem. Tais efeitos são facilmente controlados e estão sujeitos a ajuste de dose. Observou-se que há aumento de sonolência quando do uso concomitante de outros anticonvulsivantes e em doses supraterapêuticas. Além disso, esta ocorrência é maior em idosos, especialmente quando há também hipoalbuminemia e disfunção hepática. Não há estudos em pacientes com idade superior a 65 anos. A ocorrência de trombocitopenia é relacionada a níveis séricos mais elevados ($> 110 \mu\text{g/mL}$ mulheres e $> 135 \mu\text{g/mL}$ homens) e é reversível. Por apresentar metabolismo hepático, seu uso é contraindicado em casos de disfunção hepática grave e é necessária monitorização de enzimas hepáticas e bilirrubinas, cuja elevação em geral não é significativa. O uso de medicações que elevam glucuronosiltransferases, tais como fenitoína, carbamazepina e fenobarbital, deve ser cauteloso. Há relatos de teratogenicidade da droga, sendo, portanto, contraindicada em caso de gravidez. Ocorrências raras incluem pancreatite (2 casos em experiência de 1044 pacientes-ano) e arritmias.²⁸

Clinicamente já se demonstrou atividade de VPA em combinação a agentes quimioterápicos. Em estudo clínico de fase I foram incluídos doze pacientes portadores de câncer de colo de útero. Observou-se que doses de 20 a 40 mg/kg/dia de valproato de magnésio produziram nível sérico dentro da faixa de 50–100 $\mu\text{g/mL}$ (terapêutico para epilepsia) e induziram hiperacetilação de histonas H3 e H4 no tecido tumoral e em células mononucleares em sangue periférico. Neste nível de dose não se observou nenhum caso de toxicidade limitante. Não há medida de resposta tumoral neste estudo.²⁹ Posteriormente foram publicados cinco estudos clínicos (um fase I, um fase I/II e três fase II) testando a atividade de VPA em pacientes com tumores sólidos em geral, câncer de mama e câncer de colo de útero, neste último caso associado à cisplatina e radioterapia. Uma avaliação crítica dos resultados indica que VPA é segura, sendo sonolência a toxicidade limitante (observada em doses altas de 140/mg/dia). Além disso, observa-se que a hiperacetilação de histonas no tumor e em células de sangue periférico correlaciona-se com o efeito biológico do agente e com resposta em combinação a agentes quimioterápicos (80% em câncer de mama e 100% em colo de útero). Conclusões definitivas, entretanto não são possíveis pelo pequeno número e pela heterogeneidade dos pacientes.³⁰

A **Tabela 1** mostra dados de estudos fase I com VPA, observando maiores toxicidades com doses mais elevadas de VPA.

Tabela 1: Estudos fase I de VPA

Autor	Neoplasia; (N)	Combinação	Dose	Toxicidade Limitante* (N)
Bug et al., 2005³¹	LMA (26)	ATRA	50mg/kg VO	AVCi (1); Depressão (1); Dispneia (3)
Chavez-Blanco et al., 2005²⁹	Colo uterino (12)	-	20 a 40mg/kg VO por 5d	Sem toxicidade ≥ G3
Kuendgen et al., 2006³²	LMA (58)	ATRA	NS 50 a 100 µg/mL	Tremor (4); Trombocitopenia (3)
Atmaca et al., 2007³³	Sólidas (26)	-	60 mg/kg IV 5d	Confusão (7); Fadiga (2); Sonolência (2) **
Blum et al., 2007³⁴	LMA (25)	Decitabina	20 mg/kg/d	Encefalopatia (3)
Munster et al., 2007³⁵	Sólidas (48)	Epirubicina	140mg/kg/d IV 48h	Sonolência (1); confusão (3); NF (1)
Braiteh et al., 2008³⁶	Sólidas (55)	5AZA	10 a 60mg/kg/d VO para NS 75 a 100 µg /dL	Tremor e sonolência (12)†
Karpenko et al., 2008³⁷	Pulmão não-pequenas células (8)	5AZA	10 a 20 mg/kg/d VO	Neutropenia G4 (1); Neurotoxicidade G3 (2)
Su et al., 2011³⁸	Sólidas e SNC (26)‡	-	NS 75 a 100 µg /dL	Sonolência e sangramento tumoral (NS 100 a 150 µg/mL)
Wheler et al., 2014³⁹	Sólidas (52)	Bevacizumabe	5,3-10mg/kg/d VO	Alteração de estado mental G3 (2)
Falchook et al., 2014⁴⁰	Sólidas (32)	5AZA + Carboplatina	20mg/kg 7d	Fadiga G3/4 (81%), neutropenia G3/4 (69%); AEM (4)
Bilen et al., 2015⁴¹	Sólidas (26)	Lenalidomida	30 mg/kg	Confusão G3 (3), sonolência G3 (1), alteração marcha G3 (1)

LMA – leucemia mieloide aguda; ATRA – ácido transretinoico; VO – via oral; NS – nível sérico; 5 AZA – 5-Azaciditina; NF – Neutropenia febril; AEM – Alteração de estado mental

*Quando expressos, informado grau de toxicidade; todas as toxicidades observadas foram reversíveis

** Em dose de 120mg/kg

† Ocorrências grau 1 e 2, mas que impediram escalonamento de dose

‡ Pacientes pediátricos

Na **Tabela 2** estão resumidos estudos de fase I/II e fase II, com taxa de resposta de 5 a 51% em neoplasias hematológicas e sólidas.

Tabela 2: Estudos fase I/II e fase II

Estudos de Fase I/II				
Autor	Neoplasia; N	Combinação	Dose	Resposta
Garcia-Manero et al., 2006 ⁴²	LMA/SMD (54)	5AZA	50mg/kg/d VO	TR 22%
Soriano et al., 2007 ⁴³	LMA/SMD (53)	ATRA + 5AZA	50mg/kg/d VO 7d	TR 47%
Daud et al., 2009 ⁴⁴	Melanoma (39)	Karenitecina	75mg/kg/d IV d1 a d5	47% DE
Rocca et al., 2009 ⁴⁵	Melanoma (29)	DTIC + INF	NS 50 a 125mg/dL	5% RC; 11% RP; 16% DE
Munster et al., 2009 ⁴⁶	Sólidas (44)	Epirrubicina/FEC	120mg/kg IV	TR 22% (Fase I) TR 68% Fase II (câncer de mama)
Iwahashi et al., 2014 ⁴⁷	Pâncreas/Vias biliares (12)	S-1	15mg kg 2xd VO	8% RP; 83% DE
Estudos fase II				
Autor	Neoplasia; N	Combinação	Dose	Resposta
Kuendgen et al., 2005 ⁴⁸	LMA/SMD (75)	ATRA	NS 50 a 100µg/mL	TR 5% (LMA) e 16% (SMD)
Pilatrino et al., 2005 ⁴⁹	LMA/SMD (20)	ATRA	NS 45 a 100 µg/mL	Benefício clínico 30%
Candelaria et al., 2007 ⁵⁰	Sólidos (17)	Hidralazina + quimioterapia	40mg/kg/d	0% RC, 27%RP, 53% DE
Raffoux et al., 2010 ⁵¹	SMD, LMA (65)	5-AZA + ATRA	35-50mg/kg por 7d	TR 26%
Mohammed et al., 2011 ⁵²	TNE (8)	-	500mg 2xd VO; NS 50-100 µg/mL	12% RP não confirmada, 50% DE
Krauze et al., 2015 ²⁷	GBM (37)	Temozolomida + Radioterapia	25mg/kg/d	81% DE
Issa et al., 2015 ⁵³	SMD, LMA (149)	± Decitabina	50mg/kg 7d	TR 51% versus 58% combinação (NS)

TR – taxa de resposta; DE – doença estável; RC – resposta completa; RP – resposta parcial; DTIC – dacarbazina; INF – interferon alfa; FEC (5FU, Epirrubicina e ciclofosfamida); SMD – Síndrome mielodisplásica; TNE – tumor neuroendócrino, GBM – Glioblastoma multiforme, LMA – leucemia mieloide aguda

Em 2010 uma análise preliminar de estudo fase III em pacientes com câncer de colo uterino avançado submetidas à combinação de quimioterapia (platina e topotecano) a reguladores epigenéticos (hidralazina e VPA) foi publicada. Em 36 pacientes avaliadas (17 no grupo com combinação de hidralazina e VPA e 19 no grupo placebo), houve quatro respostas parciais no grupo tratamento e uma no grupo placebo, com taxa de doença estável de 29% e 32% respectivamente. A sobrevida livre de progressão teve aumento estatisticamente significativo do grupo tratamento em relação ao placebo de 6 para 10 meses ($p = 0,0384$) em seguimento de 7 meses.⁵⁴

O único estudo fase III publicado com uso de VPA teve seus resultados publicados em 2014. Tassara et al.⁵⁵ randomizaram 186 pacientes portadores de LMA acima de 60 anos para tratamento padrão de indução com idarrubicina, citarabina e ATRA ou o mesmo tratamento associado a VPA. Inicialmente, foi utilizada dose de 400mg duas vezes ao dia por via oral, posteriormente ajustada para obter nível sérico de 100mg/L do d1 ao d28 por até dois ciclos. Em uma primeira análise interina com 77 pacientes, dada toxicidade hematológica prolongada observada no primeiro ciclo, houve redução da idarrubicina, e o ácido valproico foi administrado somente no primeiro ciclo no braço experimental. Posteriormente, em uma análise interina de 186 pacientes, interrompeu-se o recrutamento pela toxicidade persistente e taxas de resposta completa inferiores no braço associado ao VPA (40 versus 52%, $p=0,14$). Ademais, em cinco anos, a taxa de sobrevida livre de recidiva foi maior no braço com VPA (24,4 versus 6,4%, $p=0,02$).⁵⁵

1.3. USO DE IHDACS EM CECP

Em CECP foi estudado o uso de iHDACs isoladamente, como o vorinostat ou romidepsin⁵⁶ em cenário de doença metastática ou recorrente, sem resposta objetiva observada. Todavia, como demonstrado anteriormente há aparente potencialização do dano celular tanto por agentes citotóxicos como radiação ionizante quando há associação de iHDAC. Recentemente foi publicado estudo de estudo fase I (NCT 01064921) de combinação de vorinostat em CECP localmente avançado submetido à quimiorradioterapia baseada em cisplatina. Foi encontrada uma alta taxa de resposta, com uma taxa de resposta completa, de 96% reforçando o racional dessa combinação no tratamento curativo destes pacientes. Já no cenário da doença metastática, a combinação com outros agentes, como erlotinibe, foi avaliada em pacientes com CECP ou pulmão em estudo de fase I, com toxicidade aceitável e taxa de resposta de 9%⁵⁷

Recentemente, Kang et al., relataram uma menor incidência de CECP em pacientes tabagistas usuários de VPA por mais de um ano para tratamento de epilepsia ou doenças psiquiátricas, sugerindo uma possível ação profilática do VPA. De uma coorte de 439.628 pacientes tabagistas, 26.911 foram identificados como preenchendo tais critérios, nos quais notou-se uma redução de 34% na incidência de CECP (HR 0,66; IC95% 0,48-0,92).⁵⁸

1.4. PAPEL DE IHDACS EM TUMORES HPV RELACIONADOS

Os tumores CECP relacionados ao papilomavírus humano apresentam distinta expressão gênica, com ausência de mutações de p53 e a expressão de p16, em contraste com o que se observa nos tumores associados ao tabaco/álcool, nos quais as mutações de p53 são frequentes e a perda do gene supressor tumoral p16 ocorre nas etapas iniciais do processo de carcinogênese.⁵⁹ Por tal razão, postula-se que há uma maior expectativa de vida nesse subtipo quando tratado exclusivamente por cirurgia³ e maior resposta a quimiorradioterapia., com um risco de óbito 58% menor quando comparado a tumores HPV negativos.⁶⁰ Neste subgrupo de pacientes, 20 a 40% evoluem com recidivas do tumor ou resistência primária à radioterapia.⁵⁹⁻⁶¹ As principais oncoproteínas codificadas pelo HPV são E6 e E7, que inativam diretamente as proteínas supressoras tumorais p53 e pRb, respectivamente, com as consequentes alterações no controle da apoptose e do ciclo celular, além de afetarem a função da telomerase e de várias proteínas supressoras de tumor com domínios PDZ (Psd-95 (proteína de densidade pós-sináptica), DlgA (supressor tumoral de disco largo de drosófila) e ZO1 (Proteína Zonula Occludens-1). E6 também interfere indiretamente com a função de p53 pela inibição da função de determinadas acetiltransferases, bloqueando a capacidade destes fatores promoverem acetilação de p53 e aumentar a estabilidade da proteína. Por sua vez, a oncoproteína E7, associa-se a deacetilases de histona, regulando a expressão de genes que favorecem a progressão do ciclo celular.⁶²

Evidências *in vitro* e *in vivo* sugerem que os tumores associados ao HPV são particularmente sensíveis aos efeitos de iHDAC. Células de câncer de colo de útero SiHa (HPV positivas) apresentaram diminuição de expressão das oncoproteínas E6 e E7 após exposição a apicidina, um iHDAC.⁶³ Em células de câncer de colo de útero HPV positivo, demonstrou-se que a tricostatina e ácido butírico, ambos iHDAC, induzem apoptose mediada por p73/E2F.⁶⁴ O VPA inibiu a proliferação das linhagens de câncer de colo de útero HeLa, SiHa e Caski. Neste contexto, o efeito antiproliferativo foi parcialmente dependente do aumento da expressão de p53 e da hiperacetilação de p53 induzida por VPA, que estaria protegido da degradação induzida pela

oncoproteína viral E6.⁶⁵ Outro estudo confirmou a ação de VPA nestas células HPV positivas e mostrou, em xenoenxertos, que a inibição de proliferação foi acompanhada por hiperacetilação de histona H3, embora sem aumento de expressão de p53.⁶⁶

Em células HeLa, VPA potencializou os efeitos dos agentes quimioterápicos cisplatina, adriamicina e gencitabina.⁶⁷ Em outro estudo com células HeLa como modelo, demonstrou-se que VPA isoladamente induz apoptose, cujo mecanismo envolveria inibição da proteína quinase B.⁶⁸ Os iHDAC vorinostat ou tricostatina, inibem a proliferação de células HeLa *in vitro* e em xenoenxertos, ação esta potencializada pelo inibidor de proteassoma bortezomibe. Células de câncer de colo de útero HPV negativas, por outro lado, foram resistentes a estes efeitos.⁶⁹ Recentemente demonstrou-se que iHDAC (ácido butírico e tricostatina) são capazes de sensibilizar as células HeLa a apoptose induzida por TNF α (*tumor necrosis factor alpha*) ou TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), efeito este mediado por inibição da transcrição do inibidor de apoptose C-FLIP (*caspase-like apoptosis regulatory protein*) e dependente da expressão da oncoproteína viral E7.⁷⁰ Por outro lado, uma preocupação quanto ao uso de VPA em tumores HPV relacionados seria a ativação de genes virais relacionados à carcinogênese uma vez que poderia ocorrer uma inibição da repressão da expressão gênica. Contudo, tal fenômeno não foi observado em estudo *in vitro* com linhagens celulares de câncer de colo uterino e tampouco em amostras de tumores de pacientes submetidas a tratamento com VPA, uma vez que os níveis de expressão dos genes E6 e E7 não sofreram aumento.⁶⁵

Sendo assim, faz-se primordial a avaliação da ação da inibição da deacetilação das histonas incorporada ao tratamento padrão em CECP correlacionada à etiologia do tumor nos dois subgrupos específicos: álcool/tabaco e HPV relacionados.

1.5. O USO DE BIOMARCADORES DE ATIVIDADE DE IHDACS

Embora haja indícios que a atividade biológica de iHDACs possa ser mensurada pelo grau de acetilação de histonas em PBMCs e também em amostras tumorais,²³ não é conhecido se este é o efeito antitumoral mais relevante desta classe de drogas.⁷¹ Visto que somente um subgrupo de pacientes possa se beneficiar do tratamento e que o efeito positivo pode não ser detectado num grupo de pacientes não selecionado faz-se necessário o estudo de biomarcadores para determinar a verdadeira atividade antineoplásica desses agentes e possíveis fatores preditores de benefício do uso de iHDACs.

Os microRNAs (miRs) são definidos como sequências de RNA não codificadoras que controlam a expressão gênica após a transcrição. Além disso, são reguladores epigenéticos, controlando a ação de DNA metiltransferases, HDACs e grupos gênicos policombinados. Por sua vez, a expressão de alguns miRs pode ser controlada por mecanismos epigenéticos. Em culturas de células demonstrou-se que a inibição da deacetilação das histonas levou tanto à inibição de expressão do miR-31,⁷² bem como a um aumento de expressão de outros miRs, como miR-200.⁷³ O miR-137 é regulado epigeneticamente e sua hiperexpressão em células cancerígenas induz a parada de ciclo celular em G1 e apoptose. Em estudo retrospectivo de pacientes com CECP demonstrou-se uma correlação de pior sobrevida com metilação de miR-137.⁷⁴ Outros microRNAs estudados como fatores prognósticos adversos em CECP incluem o miR-21,^{75,76,77} miR-184⁷⁸ e miR-203.⁷⁹ Já em uma coorte de 43 pacientes encontrou-se um nível plasmático e salivar elevado de miR-31 em relação à população controle, sugerindo seu papel como possível marcador diagnóstico.⁸⁰ Há indícios também que a regulação negativa de miR como o -449a leva a aumento de expressão de HDAC-1.⁸¹ Um dado com importantes desdobramentos para o uso clínico dos miRs como biomarcadores é a estabilidade destas moléculas em fluidos orgânicos, tais como plasma, saliva, escarro e urina, em contraste com mRNA, que é facilmente degradado.⁸² A análise da expressão de miRs em saliva mostrou-se factível, podendo discriminar amostras de pacientes com CECP e controles sadios.⁸³

A proteína HR23B, que é responsável pelo transporte ubiquitinado a proteassomas, foi identificada como um marcador de sensibilidade à apoptose induzida por iHDACs. No contexto de inibição das HDCAs, observa-se uma atividade aberrante do proteassoma. Contudo, em células sem atividade de HR23B tal efeito não é observado. A relevância deste mecanismo pode ser inferida através de um estudo retrospectivo de pacientes com linfoma cutâneo de células T, no qual houve correlação de expressão de HR23B e resposta a vorinostat, com valor preditivo positivo de 71,7%.⁸⁴

A hiperexpressão ou mutações com ganho de função em HDAC2 parecem ser um fator prognóstico adverso em neoplasias malignas. Em estudo de banco de tumores de 140 pacientes com câncer colorretal houve uma menor sobrevida em cinco anos nos pacientes HDAC2 positivos quando comparados àqueles negativos (64,2% versus 88,1% p=0,001). Este foi um fator prognóstico independente, com razão de risco de 2,6 e p de 0,03.⁸⁵ Em CECP, um estudo experimental demonstrou que a hiperexpressão de HDAC2 em linhagens celulares de carcinoma oral é relacionada a aumento de invasão celular e migração por estabilidade do fator induzido por hipóxia 1 alfa.⁸⁶ Um outro indício da correlação de hiperexpressão de HDAC2 e prognóstico

desfavorável vem de estudo retrospectivo de 93 pacientes com CECP em cavidade oral onde a hiperexpressão de tal fator por imuno-histoquímica no tumor primário foi relacionado a menor sobrevida.⁸⁷ Já em estudo de tumores de pacientes com carcinomas esporádicos gastrointestinais e de endométrio com instabilidade de microssatélites, a presença de mutação de HDAC2 aumentou a resistência de tais células tumorais ao tratamento com iHDAC.⁸⁸ A relevância da ação de iHDACs sobre HDAC2, também é denotada no estudo por Munster et al, no qual houve menor expressão de HDAC2 após tratamento com VPA.⁴⁶ Sendo assim, o uso de inibidores de deacetilação de histonas parece proporcionar uma reversão do prognóstico adverso associado a HDAC2. Em um estudo com pacientes com tumores sólidos avançados, tratados com iHDAC, uma maior expressão de HDAC2 através de análise de mRNA correlacionou-se a uma melhor sobrevida livre de progressão quando comparados ao grupo com menor expressão gênica deste biomarcador.⁸⁹

1.6. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Frente ao exposto, nossa proposta foi tratar, em uma única instituição, pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço com VPA em doses escalonadas para obtenção de nível sérico efetivo, associado ao tratamento padrão de quimiorradioterapia baseada em cisplatina. Uma análise pré-planejada para o subgrupo HPV relacionado seria realizada. Como análise exploratória, pretendeu-se avaliar biomarcadores de potencial sensibilidade a ação do ácido valproico.

Foram avaliadas a expressão de microRNAs em plasma e saliva, e a expressão de HDAC2 e HR23B no tumor por imuno-histoquímica. Procurou-se avaliar o grau de acetilação de histonas H3 e H4 em células mononucleares de sangue periférico como marcador do efeito biológico do VPA. O tamanho da amostra planejada inicialmente foi de quarenta pacientes, identificados como portadores de carcinoma epidermoide de orofaringe ou cavidade oral localmente avançado e com indicação de radioterapia associada à cisplatina. Dada a relevância prognóstica, a positividade de HPV foi avaliada por positividade de marcação imuno-histoquímica de p16 e determinação da presença de HPV de alto risco. Como controle histórico foi utilizado um grupo tratado na mesma instituição exclusivamente por radioterapia e cisplatina, no qual se encontrou uma taxa de resposta de 60%.⁹⁰

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

- Avaliação da taxa de resposta por RECIST (*Response evaluation criteria in solid tumors*) versão 1.1 da terapêutica combinada de quimiorradioterapia definitiva baseada em cisplatina associada a ácido valproico, definida como resposta parcial ou completa na população incluída no estudo de acordo com a intenção de tratamento

2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliação de principais toxicidades ao tratamento segundo NCI CTCAE versão 4.0
- Determinar sobrevida livre de progressão
- Determinar sobrevida global
- Comparação do desfecho primário e análises exploratórias entre os subgrupos HPV positivo e HPV negativo
- Avaliação de qualidade de vida

2.3. OBJETIVOS EXPLORATÓRIOS

- Determinação do grau de acetilação de histonas H3 e H4 em células mononucleares de sangue periférico
- Determinar expressão de microRNAs em sangue periférico e saliva
- Determinar expressão de HDAC2 e HR23B por imuno-histoquímica no tumor primário

3. MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO

Trata-se de estudo de fase II de braço único segundo desenho de Simon em 2 estágios.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP)(Anexo III) e registrado no ClinicalTrials.gov sob o número NCT01695122.

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo sob o processo 2014/26965-5, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Gilberto de Castro Junior.

3.2. POPULAÇÃO DO ESTUDO: CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

- CECP orofaringe (tonsila, palato mole, base da língua, paredes lateral e posterior da faringe) e cavidade oral confirmado histologicamente julgado irressecável, segundo avaliação prévia da Equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço na rotina do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Icesp). Estes critérios incluem a invasão das seguintes estruturas: base de crânio, fáscia pré-vertebral, coluna cervical e artéria carótida, além de uma avaliação de risco de sequelas funcionais.

- Indicação de quimiorradioterapia definitiva, segundo rotina institucional do Serviço de Oncologia Clínica do Icesp⁹¹

- Ausência de tratamento prévio para o tumor, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia alvo ou outro agente investigacional; biópsia cirúrgica foi permitida.

- Outras neoplasias que não em cabeça e pescoço com intervalo livre de doença maior ou igual a cinco anos; carcinoma basocelular de pele e displasia cervical *in situ* se ressecados.

- Doença mensurável segundo definido por RECIST v.1.1, definida como lesão tumoral maior que 10mm ou linfonodal maior que 15mm no menor eixo em tomografia.

- Idade inferior ou igual a 65 anos

- Performance status ECOG 0-2 (*Karnofsky* > 60%)

- Capacidade de compreensão e concordância em fornecer consentimento por escrito

- Adequada função renal, definida como *clearance* de creatinina igual ou superior a 60 mL/min
- Adequada função hepática, definida como níveis de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase iguais ou inferiores a três vezes o limite superior do normal e bilirrubina total menor que 1,5 vezes o limite superior da normalidade.
- Nível sérico de magnésio superior ao limite inferior da normalidade.
- Hemoglobina superior ou igual a 9 g/dl; contagem de neutrófilos igual ou superior a 1.500/mm³; contagem de plaquetas igual ou superior a 100.000/mm³
- Ausência de prolongamento de intervalo QT corrigido
- Expectativa de vida superior a 12 semanas

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Gravidez; métodos contraceptivos eficientes devem ser garantidos a mulheres em idade fértil.
- Presença de metástases à distância
- Histórico de hipersensibilidade a compostos química ou biologicamente semelhantes a VPA, tais como outros anticonvulsivantes
- Uso crônico de VPA
- Uso crônico de anticonvulsivantes para controle de epilepsia
- Disfunção neurológica incapacitante
- Doença associada não controlada
- Hipoalbuminemia moderada, definida como albumina sérica inferior a 2,8 g/dL.
- Hepatite B, C ou HIV (vírus da imunodeficiência humana) ativos conhecidos

3.4. TRATAMENTOS E PROCEDIMENTOS

Após assinatura de termo de consentimento livre esclarecido, inclusão e verificação dos critérios de elegibilidade no estudo, os pacientes foram submetidos a:

3.4.1. INCLUSÃO NO ESTUDO

- História clínica
- Exame físico, peso, altura, sinais vitais
- Avaliação de performance status pela escala do *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG)
- Hemograma e bioquímica; incluindo testes de função hepática e renal.
- Tomografia computadorizada de pescoço e face
- Radiografia de tórax pósterio-anterior e perfil ou tomografia computadorizada de tórax
- Avaliação nutricional; em caso de perda ponderal superior a 20% nos últimos seis meses iniciada suplementação e considerada alimentação enteral
- Eletrocardiograma
- Avaliação odontológica
- Mulheres com idade inferior a 50 anos foram submetidas a dosagem de gonadotrofina coriônica humana (β -HCG)
- Determinação de status HPV através de imunoexpressão de p16 positiva e RT-PCR no tumor primário

3.4.2. TRATAMENTO

Os pacientes foram submetidos ao tratamento padrão institucional, que consiste em radioterapia associada a cisplatina, concomitante à droga experimental. No anexo I encontra a tabela de fluxo de atendimento dos pacientes.

A radioterapia foi realizada por meio de acelerador linear de elétrons com energia de fótons de 6-15 MV (mega-volts) e energia de elétrons de 6-18 MeV (mega elétrons-volt). Os pacientes foram imobilizados com máscara termoplástica, apoio de pescoço e retificador de ombros. Todos os pacientes foram submetidos à simulação complexa com tomografia computadorizada de face e pescoço e planejamento tridimensional. O tratamento foi realizado com dose diária de 2 Gy. As regiões com envolvimento subclínico receberam dose total de 50 Gy em 25 frações. As regiões com doença macroscópica identificada em tomografia computadorizada ou ressonância magnética, laringoscopia direta ou exame clínico, receberam 70 Gy em 30 frações. Os campos foram reduzidos para limitar a dose em medula espinhal a menos de 45 Gy. A dose na região posterior do pescoço foi complementada com elétrons até 50 Gy se doença subclínica ou 70 Gy se doença macroscópica. A região cervical inferior foi tratada com campo anterior de fótons com dose total de 50 Gy em 25 frações. A radioterapia foi diária por cinco dias por semana por sete semanas consecutivas.

A administração de cisplatina foi feita via endovenosa com 100mg/m² no 1º e 22º e 43º dia de radioterapia, com pré-medicação antiemética (dexametasona 20mg e ondansetrona 8mg) e hidratação contendo manitol, cloreto de potássio, sulfato de magnésio e soro fisiológico.

Ácido valproico foi administrado por via oral em doses escalonadas a partir de 15mg/kg/d por via oral diariamente até que a concentração plasmática efetiva de 40 a 100 µg/mL, mensurada 4h após a ingestão da droga fosse atingida. A administração ocorreu duas semanas antes do início da terapêutica com quimiorradioterapia. Nesse período foi feita avaliação de acetilação de histonas H3 e H4 em sangue periférico. Após a inclusão de 10 pacientes no estudo, foi realizada uma análise interina de segurança. Dadas as toxicidades apresentadas (abaixo descritas) o protocolo foi emendado e modificada a administração da cisplatina e do ácido valproico. Sendo assim, os pacientes receberam duas doses de cisplatina 100mg/m² no 1º e 22º dia da radioterapia. Durante a quimiorradioterapia, o ácido valproico foi administrado diariamente, exceto nas semanas de realização da cisplatina, conforme delineado a seguir:

Para avaliação de biomarcadores, foram coletados saliva e plasma para análise de microRNAs e plasma para determinação de acetilação de histonas. As coletas para análise de microRNAs foram realizadas antes do início do tratamento (P0), após 2 semanas de VPA (P1) e no momento de reavaliação de resposta oito semanas após o término do tratamento (P3). Para

3.4.4. INTERRUPÇÕES DE TRATAMENTO E AJUSTE DE DOSES

Interrupções na radioterapia foram previstas em caso de toxicidade muco-cutânea ou radiodermite em campo grau 4 (critérios do *Radiation Therapy Oncology Group*) ou a critério do rádio-oncologista responsável. Nessa situação, a administração de VPA e de cisplatina foi também suspensa. Quando houve suspensão somente de cisplatina, o tratamento com VPA foi continuado em concomitância à radioterapia.

Na ocorrência de toxicidade atribuível ao VPA, tais como neurotoxicidade, diarreia e náuseas graus 1, o tratamento prosseguiu com observação dos sintomas. Se ocorresse toxicidade grau 2, o ajuste de dose seria realizado com retorno ao escalonamento anterior de dose. Caso não tivesse ocorrido escalonamento de dose, o agente seria reduzido em 20%. Em caso de toxicidade grau 3, a droga seria suspensa.

Em caso de toxicidade hematológica, seria feito ajuste da dose de cisplatina da seguinte forma:

- Se neutrófilos entre 500 e 1000/mm³, adiar em uma semana. Se recuperação de neutrófilos (acima de 1000/mm³), administração de 75% da dose
- Se plaquetas entre 100 e 75mil/mm³ administração de 75% da dose. Se plaquetas inferiores a 75 mil/mm³ adiar em uma semana. Se não houvesse recuperação, a quimioterapia seria omitida.

Se houvesse plaquetopenia persistente superior a grau 2 a dose de VPA seria reduzida ao escalonamento anterior de dose. Se observada plaquetopenia superior a grau 3, o VPA seria suspenso.

Em caso de toxicidade grau 3 ou 4 atribuíveis a cisplatina, a medicação seria retomada quando houvesse regressão das mesmas. Na retomada, previa-se redução de dose em 20%. Em caso de recorrência, a quimioterapia seria suspensa.

O uso de hemocomponentes ficou a critério do investigador. O uso de fatores de estimulação de crescimento de granulócitos e de eritrócitos não foi permitido para correção ou prevenção de toxicidades.

Em caso de queda no *clearance* de creatinina entre 45 a 59 ml/min foi administrado 75% da dose de cisplatina. Se a creatinina se elevasse a níveis superiores a 1,8 mg/dL ou com queda de *clearance* de creatinina superior à descrita, a cisplatina seria suspensa.

Conforme o padrão institucional, os pacientes foram acompanhados pela equipe da medicina bucal para profilaxia e tratamento de mucosite através de laserterapia em baixa dose.⁹²

3.4.5. AVALIAÇÃO DE RESPOSTA

Avaliação de resposta radiológica foi feita por tomografia computadorizada de face e pescoço oito semanas após término do tratamento radioterápico. Pacientes com status nodal N2 ou N3, ou persistência de doença foram avaliados para esvaziamento eletivo do pescoço após término de protocolo terapêutico. Para determinação de doença residual não vista na tomografia computadorizada de face e pescoço foi feita laringoscopia direta e avaliação clínica, realizada pela Equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Icesp. Em caso de resultados inconclusivos, os pacientes foram submetidos à tomografia por emissão de pósitrons com fluorodeoxiglicose.

3.5. CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS

Desenho de estudo fase II segundo o método de Simon de 2 estágios.⁹³ Considerando-se um incremento de taxa de resposta de 60% no grupo controle histórico⁹⁰ para 80% no grupo -experimental, com erro alfa de 5% e beta de 20% planejou-se inicialmente inclusão de 40 pacientes. O estudo prosseguiria a segunda fase do método de Simon caso oito de 13 respostas fossem encontradas na primeira fase e seria considerado positivo se 25 de 35 respostas fossem atingidas na segunda fase.

A sobrevida livre de progressão foi definida como tempo de início de tratamento até a ocorrência de progressão radiológica segundo RECIST versão 1.1⁹⁴ ou óbito. A sobrevida global foi definida como tempo de início de tratamento até óbito por qualquer causa.

As taxas de sobrevida livre de progressão foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevida comparadas pelo teste de *log-rank*. Possíveis relações entre fatores preditivos e taxa de resposta foram avaliados pelo teste exato de Fisher ou Chi-Quadrado quando apropriado. Foram considerados como estatisticamente significativas as comparações que apresentaram $p < 0,05$.

Análises de eficácia foram feitas com base na intenção do tratamento. Análises de segurança foram feitas para os pacientes que receberam pelo menos uma semana de tratamento concomitante de VPA e radioterapia.

Uma análise interina de segurança seria feita após o término de inclusão na primeira fase (13 pacientes).

4. ANÁLISES EXPLORATÓRIAS

4.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ACETILAÇÃO DE HISTONAS H3 E H4 EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO E DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS

Todos os pacientes foram submetidos à coleta de material biológico para avaliação de acetilação de histonas H3 e H4 em células mononucleares em sangue periférico e expressão de miRs em plasma e em saliva. O nível plasmático inicial de miRs e expressão em saliva foi comparado àquele encontrado em uma população controle de sete voluntários sadios como valor de referência.

As dosagens de acetilação de histonas e expressão de miRs foram feitas antes do início do uso de ácido valproico (d1 VPA, basal) e com duas semanas de tratamento (d14 VPA, P1). Ao final da quimiorradioterapia foi feita dosagem de acetilação de histonas H3 e H4 em células mononucleares em sangue periférico (P3). No mesmo momento da avaliação de resposta com tomografia computadorizada de face e pescoço foi feita uma dosagem final plasmática de expressão de microRNAs (conforme delineado no item 4.2). Variações de três dias foram permitidas. Quando ocorreu a suspensão definitiva de VPA a próxima aferição programada de biomarcadores foi omitida. Na ocorrência de visita extra, a data de realização de biomarcadores seria feita conforme o planejamento inicial.

4.1.1. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS

4.1.1.1. PROCESSAMENTO SANGUE PERIFÉRICO

Foram coletados 10 ml de sangue periférico em tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) que foi processado em temperatura ambiente em até 30 minutos a partir da coleta. O plasma foi separado por centrifugação a 800g durante 10 minutos; o sobrenadante foi transferido para microtubo de 2 ml RNase/DNase *free*, submetido a nova centrifugação a 3000g por 5 minutos a 4°C para retirada de restos celulares. Após adição de inibidor de RNase, alíquotas contendo 200µl foram armazenadas em freezer a -80°C.

Após separação do plasma o restante do sangue foi diluído com PBS 1x na proporção de 1:1 e 2 partes dessa mistura aplicada cuidadosamente sobre 1 parte da solução de Ficoll-Hypaque densidade 1070, contida em tubo de vidro com fundo cônico. O material foi submetido centrifugação a 500g por 30 minutos a temperatura ambiente. Com auxílio de pipeta Pasteur foram coletadas cuidadosamente as células presentes na interfase PBS/Ficoll-Hypaque e transferidas para um microtubo de 2,0 mL. Nova centrifugação a 400g por 5 minutos foi realizada e o sobrenadante foi retirado e descartado. As células foram lavadas 2x com 1 mL de PBS 1X seguido de centrifugação a 400g por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante o *pellet*

foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 1X e a quantidade de células foi obtida por meio de contagem em câmara de Neubauer. Após contagem foram feitas alíquotas conforme a quantidade de leucócitos necessária para a detecção da acetilação das histonas H3 e H4. As alíquotas foram submetidas à centrifugação a 400g por 5 minutos para retirada do sobrenadante e o *pellet* de células foi armazenado em freezer a -80°C.

4.1.1.2. DETERMINAÇÃO DA ACETILAÇÃO DE HISTONAS EM MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

A quantificação da acetilação tanto da H3, quanto H4 foi realizada com o kit: *EpiQuik™ Global Histone H3 Acetylation Assay Kit (Epigentek Group Inc., Brooklyn, NY)*. As soluções denominadas de GF1 a GF10 no kit foram utilizadas para histona H3 e GE1 a GE10 para histona H4.

O *pellet* de células (mononucleares) com 1×10^6 células foi ressuspensionado com 100 µl de solução GF1 (tampão de lise 10x) diluída em água destilada na razão 1:10 e incubado em gelo por 5 minutos, homogeneizando em vórtex ocasionalmente. Os debris de células foram recuperados com centrifugação a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e adicionado ao *pellet* 10 µl da solução GF1 diluída seguido de adição 3 volumes da solução Glicerol/GF2 (1:10), posterior homogeneização e incubação no gelo por 5 minutos. O material foi centrifugado a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de 1,5 ml e adicionada uma solução de ácido tricloroacético 100% na razão 1:4 de sobrenadante, que foi incubada no gelo por 30 minutos. O precipitado foi coletado com centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e adicionado 1 ml de acetona contendo 0,1% de ácido clorídrico, homogeneizado e incubado em gelo por 1 minuto. Seguiu-se com nova centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e lavado o precipitado com 1 ml de acetona, incubado em gelo por 1 minuto e centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e deixada a acetona secar por 5 minutos. Foram adicionados 10 µl de água destilada para prosseguir a determinação da concentração proteica.

4.1.1.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

A concentração das proteínas extraídas foi determinada com o kit da *Molecular Probes - Qubit® Protein Assay Kits*. A solução de trabalho (*Work Solution*) foi preparada utilizando-se as soluções *Protein Reagent* e *Buffer protein* na proporção 1:200. Para a calibragem das leituras foram preparadas as soluções padrões, com a diluição de cada solução padrão (A, B, C) sendo 10 µL do padrão em 190 µL da *Work Solution*. As amostras foram preparadas sendo 1,0 µL de

cada amostra em 199 μL de *Work Solution*. Padrões e amostras foram incubados à temperatura de 23°C por 15 minutos e imediatamente submetidos à leitura no Qubit®.

4.1.1.4. DETERMINAÇÃO DA ACETILAÇÃO DAS HISTONAS H3 E H4

A concentração de proteína foi ajustada a 200 ng/ μL ou 400 ng/ μL com *Histone Buffer*, e foram adicionados 5 μL (1-2 μg) da solução de proteína na região central de cada poço. A placa foi incubada a 37°C (sem umidade) durante 60-90 minutos, para evaporar a solução e secar os poços. Em seguida, 150 μL de *Blocking Buffer* foram adicionados aos poços e o material permaneceu durante 30 minutos a 37°C.

A solução foi removida e os poços lavados três vezes com 150 μL do tampão de lavagem 1X concentrado. O anticorpo de captura foi diluído no momento do uso com o tampão do anticorpo na proporção de 1:100 e 50 μL foram adicionados por poço. O material permaneceu em temperatura ambiente durante 60 minutos sob agitação agitador orbital (50-100 rpm).

1. Os poços foram lavados e aspirados com 150 μL de 10X *Wash Buffer* diluídos quatro vezes.

2. Com o *Detection Antibody* diluído, na proporção de 1: 1000, adicionou-se 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *Antibody Buffer*. Ainda foram adicionados 50 μL de *Detection Antibody* diluído aos poços, e incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos.

3. Os poços foram aspirados e lavados com 150 μL de 10X *Wash Buffer* diluído quatro vezes, e incubados por 3 minutos para a última lavagem.

4. Foram adicionados 100 μL de *Developing Solution* aos poços, incubou-se à temperatura ambiente durante 2-10 minutos. Monitorizou-se o desenvolvimento da cor na amostra e poços de padrão (azul).

5. Foram adicionados 50 μL de *Stop Solution* aos poços para leitura da absorbância num leitor de microplacas a 450 nm.

6. Calculou-se a porcentagem de histona H3, ou H4 acetiladas, conforme as seguintes fórmulas:

% Acetilação de = histonas	$\frac{\text{Valores de leitura das amostras} - \text{Valores de leitura do branco}}{\text{Valores de leitura dos controles} - \text{Valores de leitura do branco}} \times 100\%$
-------------------------------	---

Para uma melhor acurácia na determinação do grau de acetilação realizou-se um cálculo:

Quantidade = (ng/mg)	$\frac{\text{Valores de leitura das amostras} - \text{Valores de leitura do branco}}{\text{Coeficiente angular da reta obtida no gráfico}} \times 100\%$
-------------------------	--

4.2. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS

4.2.1. COLETA DE SALIVA

Os pacientes e voluntários sadios foram instruídos a não comer, beber, fumar ou fazer qualquer procedimento de higiene oral por pelo menos uma hora antes da coleta.

A coleta ocorreu preferencialmente na parte da manhã, onde o participante da pesquisa foi orientado a sentar confortavelmente, lavar a boca com água deionizada e manter a cabeça levemente inclinada para frente. Sem fazer movimentos orofaciais, ele/ela esperou a saliva acumular no assoalho da boca e a cada 60 segundos cuspiu em um tubo graduado que foi mantido em gelo durante a coleta. Cerca de cinco minutos de coleta foi suficiente para obter 3mL de saliva habitualmente.

4.2.1.1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SALIVA

A saliva coletada foi transferida para microtubos com 2 mL de capacidade e submetida à centrifugação por 10 minutos a 1500g e a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e descartado o *pellet*. Realizada nova centrifugação de 5 minutos a 3000g e a 4°C. Essa centrifugação separou do sobrenadante os restos celulares que ainda restavam. Ao sobrenadante foram adicionados 40UI de RNase *out* para cada 1 ml de saliva e estocadas alíquotas com 250 µl a -80°C.

4.2.1.2. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

O RNA total foi extraído com o “*miRNeasy Mini Kit*” (número de catálogo 217004-Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme orientação do fabricante. Resumidamente, a 200 µl de plasma foi acrescentado 1 ml do reagente *QIAzol*®, a mistura foi agitada com auxílio do vórtex por um minuto e incubada em temperatura ambiente por cinco minutos. Como controle exógeno foi adicionado 1µL de RNA Sp6 (*Spike-in template*). Posteriormente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e agitou-se com vórtex por 15 segundos até obtenção de uma solução homogênea. Após incubação por três minutos em temperatura ambiente a mistura foi submetida à centrifugação por 12.000 g, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo microtubo e 1,5 volumes de etanol 100% foram adicionados. A amostra foi aplicada na minicoluna *RNeasy MinElute spin* e submetida à centrifugação a 8.000 g, durante 15 segundos à temperatura ambiente e o filtrado foi descartado. Foram realizadas três lavagens sucessivas com os tampões RWT, RPE e etanol 80% utilizando-se os mesmos parâmetros de centrifugação, descritos acima e com o descarte do

filtrado em cada etapa. A coluna foi transferida para novo microtubo e o RNA total foi eluído com inicialmente com 14 µL de água livre de RNase, mas posteriormente aumentou-se o volume para 30 µL que resultou em uma maior recuperação do RNA. A concentração foi determinada por espectrofotometria 260/280 nm no *NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific)* e o RNA que foi armazenado em ultrafreezer -80°C.

4.2.1.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVO (RT-QPCR) COM O SISTEMA *TaqMan MicroRNA Assay-Array* NO PLASMA

A determinação da expressão dos miRs em plasma foi realizada por qPCR utilizando o sistema *TaqMan® Low Density Array (TLDA)*. A reação de qPCR ocorre de modo exponencial, sendo assim a cada ciclo da reação, novas moléculas de cDNA dupla-fita são sintetizadas. O fluoróforo utilizado no processo é incorporado a cada cadeia de DNA recém-sintetizada, e, conseqüentemente, o nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente. Assim, o número de ciclos correspondentes ao início da emissão de fluorescência (*ciclo threshold* – Ct) é inversamente proporcional ao nível de expressão do transcrito, sendo menor durante a aquisição de sinal de amostras que possuem maior abundância do gene em questão (Morrison e col., 1998). O sistema *TaqMan® Human microRNA A Array v2.0 (Applied Biosystems, número de catálogo 4398965, Foster City, Estados Unidos da América)* é composto por uma placa de 384 poços que contém em cada poço um par de *primers* liofilizado específico para a amplificação de um determinado microRNA. Como essa placa contém 384 poços, incluindo quatro controles normalizadores, sendo três endógenos em duplicatas e um negativo (correspondente a sequências não relacionadas ao genoma de *Homo sapiens*) essa metodologia possibilita a quantificação de até 377 microRNAs humanos.

Na reação de transcrição reversa o RNA total (40 - 60ng) foi convertido em DNA complementar com o auxílio do kit otimizado *Megaplex™ (Applied Biosystems, número de catálogo 4399966, Foster City, Estados Unidos)*. Esse kit possui um *pool* de diferentes *primers* (transcrição reversa *Primers Human Pool A*), sendo que cada um reconhece e é responsável pela transcrição reversa de um microRNA específico. Na reação, 0,8µL de transcrição reversa *Primers Human Pool A* 10x; 15µL de *AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase* (50U/µL); 0,8µL de *Reverse Transcription Buffer* 10x; 0,9µL de dNTPs (100mM); 0,9µL de MgCl₂ (25mM) e 0,1µL de inibidor de RNase (20U/µL) foram adicionados ao RNA total. Em um termociclador, a reação foi submetida a 40 ciclos de três diferentes temperaturas, 16°C por dois minutos, 42°C por um minuto e 50°C por um segundo, seguidos de incubação a 85°C por cinco minutos para inativação da enzima. Em seguida, 2,5 µL do produto da transcrição reversa foram pré-amplificados

utilizando 2,5 μ L de *Megaplex™ PreAmp Primers Human Pool A 10x* e 12,5 μ L de *TaqMan® PreAmp Master Mix 2x* (*Applied Biosystems*, número de catálogo 4399233 e 4391128, respectivamente, *Foster City*, Estados Unidos da América). Essa mistura foi submetida a diferentes temperaturas no termociclador sendo: 95°C por 10 minutos, 55°C por dois minutos, 72°C por dois minutos, 12 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por quatro minutos e finalmente incubação à 99,9°C por 10 minutos para inativação da enzima.

O produto da pré-amplificação foi diluído em 75 μ L de tampão Tris-EDTA - pH 7.4 a 8.0 (TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH8,0) dos quais 9 μ L são utilizados para a realização da reação de qPCR pela adição de 450 μ L de *TaqMan 2x Universal PCR Master Mix No AmpErase* e 441 μ L de água ultrapura. Dessa mistura, 100 μ L foram aplicados em cada uma das oito canaletas da placa do sistema TLDA. Após a aplicação das amostras, a placa foi submetida a duas centrifugações de um minuto cada na rotação de 1.200g e selada. A reação foi realizada no equipamento *7900PCR System* (*Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos da América*) nas seguintes condições: 50 °C por dois minutos e 94,5 °C durante 10 minutos seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos e 59,7 °C por um minuto.

4.2.1.4. ANÁLISE DOS DADOS DE PERFIS DE MICRORNAS

Para análises de expressão do perfil de microRNAs os valores de Ct (*cycle threshold*) foram determinados com o programa *Real Time SDS® Software* (*Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos da América*). Através do uso do programa R, prosseguiu-se a análise. A todos os valores indeterminados atribuiu-se o valor de 40. A normalização dos dados foi feita pela expressão de Δ Ct, que é a diferença entre o Ct do miR alvo e do Ct do microRNA normalizador (miRs endógenos).⁹⁵

Os dados de normalizados de PCR foram multiplicados por -1 para representar a expressão de miRs. O teste t para duas amostras foi realizado. Devido aos múltiplos testes com as amostras, os valores de p individualmente podem não ser significativos. Sendo assim, analisando os testes em conjunto, a distribuição dos valores de p deveria ser uniforme (sob a hipótese nula de que os miRs não são discriminativos). Por outro lado, se algum dos miRs for discriminatório, antecipa-se que haveria uma abundância de valores baixos de p. Isto pode ser representando através do modelo de mistura beta-uniforme (BUM). Para determinar significância dos miRs diferencialmente expressos, cortes de valores de p foram determinados através de valores de *false discovery rate* (FDR). Posteriormente, os achados desta análise foram submetidos à validação por RT-qPCR.

4.2.1.5. VALIDAÇÃO DOS MICRORNAS DE INTERESSE POR RT-QPCR

A validação dos miRs de interesse foi realizada utilizando ensaios *miRNA TaqMan® Advanced* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Estados Unidos da América), conforme recomendações do fabricante (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf).

O sistema *TaqMan® Advanced miRNA Assays* é composto por pré formulados grupos de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e sonda desenhados para análise da expressão de miRs. Os ensaios podem detectar e quantificar as formas maduras dos miRs a partir de 1–10 ng of total RNA extraídos de tecidos ou de 2 µL de RNA total extraído de plasma ou soro. As reações foram conduzidas a partir de 2 µL do RNA Total extraído neste caso do plasma, seguindo-se as instruções do fabricante resumidas no fluxograma abaixo:

Para a análise de dados os valores de Ct foram determinados com o programa *StepOne v2.3* (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos da América). Os valores de Ct obtidos em todas as amostras para 3 miRs: miR-21-5p, miR-26b-5p e miR-425-5p foram submetidos à análise pelo algoritmo *NormFinder* para determinação da estabilidade da expressão dos mesmos entre as amostras analisadas. O miR-26b-5p apresentou a maior estabilidade e foi utilizado como normalizador interno (cálculo ΔCt : Ct miR alvo – Ct miR-26b) e uma amostra foi utilizada como

controle externo para normalização das várias placas, ou seja, estava presente em todos os ensaios, e foi usada então no cálculo do $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt amostra alvo - ΔCt amostra referência). O valor final foi expresso como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.2.1.6. ENSAIOS FUNCIONAIS COM EXOSSOMOS

Primeiramente, prosseguiu-se à separação dos exossomos. As vesículas extracelulares foram isoladas em centrifugações sucessivas para retirada de células/restos celulares, bem como uma centrifugação à 10.000 g por 30 minutos para retirada de vesículas de tamanhos maiores. Além disso, o sobrenadante antes de ser submetido à ultracentrifugação foi filtrado com filtro 0,2 μm com intuito de enriquecimento de vesículas de tamanho menor, equivalente ao tamanho de exossomos. A denominação de exossomos foi atribuída, portanto, para as vesículas isoladas do plasma por ultracentrifugação. Inicialmente 1 mL de plasma foi diluído com 1mL de PBS 1x e a mistura filtrada com filtro 0,2 μm e transferido para um tubo específico de ultracentrifugação. Em seguida cerca de 9 mL de PBS 1x foi filtrado no mesmo filtro da respectiva amostra a fim de completar o volume do tubo de ultracentrifugação. Em seguida as amostras foram submetidas a uma ultracentrifugação de 100.000x g por duas horas a 4°C no rotor SW-41Ti (*Beckman Coulter e Beckman Optima XL-100K, Ultracentrifuge, Brea, Estados Unidos da América*). O sobrenadante da ultracentrifugação foi descartado e o *pellet* resultante da ultracentrifugação, enriquecido em exossomos, foi ressuspendido em 100 μL de PBS 1X para posterior caracterização dos exossomos e utilização nos experimentos funcionais. Dez microlitros foram separados para contagem e verificação do tamanho das partículas no equipamento *NanoSight* e o restante armazenado em alíquotas no freezer -80°C.

A quantificação de exossomos e a distribuição dos tamanhos foi realizada através do equipamento *NanoSight LM14* no Centro Internacional de Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center. O *Malvern NanoSight LM14* utiliza a tecnologia *Nanoparticle Tracking Analysis* para quantificar a distribuição de partículas por tamanho absoluto de 10nm - 1000nm em solução. Essa tecnologia utiliza propriedades de espelhamento de luz e movimento browniano para obter a distribuição de tamanho e a concentração das partículas em suspensão líquida. As partículas no fluido são iluminadas por um feixe de raio laser (com comprimento de onda de 532nm) que, por conseguinte dispersam a luz que é captada por um microscópio óptico convencional com ampliação de 20x sobre o qual está montada uma câmera. O *Nanoparticle Tracking Analysis image analyses software* captura o tamanho de muitas partículas simultaneamente e os resultados são apresentados como a distribuição da concentração das partículas por tamanho.

Para a realização de ensaios funcionais, linhagens celulares humanas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço SCC-4, SCC-9, SCC-15 e SCC-25 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, sendo originalmente disponíveis na *American Type Culture Collection*. As células foram enviadas pelo Banco aderidas em garrafas de cultura de 25 cm². No recebimento foi feita uma inspeção visual no meio de cultura para observar se não apresentava sinais de contaminação (turvação) e uma visualização das condições das células foi realizada no microscópio invertido. As garrafas foram mantidas por 2 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e a 37°C e posteriormente, foram removidas da garrafa para transferência e expansão em garrafa de 75 cm²: as células foram lavadas com de PBS EDTA estéril, com pH 7,2, o qual foi descartado e em seguida as células foram tratadas com solução de tripsina a 0,05% durante 3-5 minutos na estufa afim de destacá-las das garrafas. Para neutralizar a ação da tripsina foi adicionado meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle* (DMEM) e meio HamF12 (proporção 1:1) o qual a partir deste momento será denominado DMEM/F12, acrescido de penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, gentamicina 50 µg/ml, anfotericina B 2,5 µg/ml e hidrocortisona 0,4 µg/ml que foi acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10%. O teste de viabilidade celular foi realizado utilizando *tripan blue* 0,2% (na proporção 1: 1) e foi feita a contagem do número de células em Câmara de Neubauer. As células em suspensão foram centrifugadas em a 1500 g por 3 minutos, ressuspendidas em meio de cultura e transferidas para garrafa de 75 cm². Ao atingir confluência em torno de 60%, o procedimento foi repetido para expansão da cultura em garrafa de 125 cm² seguido de congelamento das células em alíquotas contendo em torno de 1×10^6 células, que foram mantidas em nitrogênio líquido.

Posteriormente prosseguiu-se à realização da avaliação de atividade metabólica por formação de cristais de formazam (MTT). Para avaliar a toxicidade da cisplatina, inicialmente foi realizada uma curva para determinação da dose de cisplatina necessária para morte de aproximadamente 50% das células (IC₅₀) para cada linhagem. As linhagens foram semeadas em placas de 96 poços, sendo triplicatas com $1,5 \times 10^4$ células por poço que foram mantidas em estufa por 14-16 horas para permitir adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de cisplatina (5µM, 10µM, 20µM, 50µM e 100µM) e avaliadas após 24 e 48 horas. Ao final do tempo de tratamento, foram adicionados 16 µL de solução de sal de tetrazolium (MTT 5 µg/mL) em cada poço e as placas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos em estufa.

Em seguida, o meio foi removido e foram adicionados 150 µL de dimetilsulfóxido em cada poço. Após observar a completa solubilização dos cristais foi realizada a leitura da

densidade óptica em espectrofotômetro no canal de 595 nm. Posteriormente, novos ensaios foram realizados com adição dos exossomos na concentração de 10^8 partículas/ml para cada 10^4 células. As células foram plaqueadas com meio de cultura descrito anteriormente, porém suplementado com 10% de SFB depletado de vesículas extracelulares. Para isso, SFB foi submetido à centrifugação em $100.000 \times g$ por 16 horas. O sobrenadante foi retirado com cuidado em cabine com fluxo para cultivo celular, e submetido à filtração com filtro $0,2 \mu m$. Após 24 horas, um *pool* de exossomos (4 a 7 pacientes/grupo) dos grupos de voluntários saudáveis ($n = 7$), de amostra de pacientes com resposta ao quimiorradioterapia + VPA coletada antes do tratamento (P0-R, $n = 6$) e de pacientes que não responderam (P0-NR, $n = 4$) foram acrescentados. As culturas foram mantidas por mais 24 horas em estufa antes da adição das doses de IC50 e a atividade metabólica foi avaliada nos períodos de 24 horas e 48 horas de tratamento.

Um segundo ensaio realizado foi o de migração celular das linhagens celulares tratadas com os exossomos *in vitro*, através do ensaio *wound healing* ou *cell scratch*⁹⁶. Trata-se de um método que mimetiza a migração celular durante a cicatrização de feridas *in vivo*. O ensaio consiste na realização de uma raspagem na superfície de uma camada de células confluentes, e avaliação do fechamento desta lesão através da migração celular. Para isso, as células foram mantidas em placas de 24 poços em meio DMEM/F12 com 10% SFB livre de exossomos, até atingirem confluência de aproximadamente 90%. Após este período foi realizada uma raspagem na camada de células utilizando uma ponteira de $100 \mu L$. As células foram lavadas 2x com PBS 1x e colocadas em meio DMEM/F12 com 10% SFB livre de exossomos com adição dos exossomos proveniente dos diferentes grupos de pacientes/controles. A cultura foi mantida em presença de 5 % de CO₂ em uma câmara acoplada ao microscópio invertido *Invitrogen™ EVOS™ FL Auto Imaging System* (Thermo Fisher Scientific) com a realização de fotos a cada 1h. Para determinar a taxa de migração utilizou-se o programa Image J.

A análise estatística de tais ensaios com linhagens celulares consistiu em testes paramétricos *T-student* e ANOVA com auxílio do programa *IBM Statistical Package for Social Sciences Statistics for Windows*, versão 20.0. Armonk, Nova Iorque, Estados Unidos da América, IBM Corp.

4.3. EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE HR23B E HDAC2

Foi feita a avaliação imuno-histoquímica das amostras tumorais obtidas ao diagnóstico de todos os pacientes quanto a expressão de HR23B e HDAC2. O objetivo foi correlacionar tais fatores com o prognóstico dos pacientes.

Cortes de 5 µm de blocos de parafina do tumor primário foram desparafinados e preparados para incubação com os anticorpos anti-HR23B (clone Ab 88503; Abcam®, Cambridge, Reino Unido; diluição 1:400) e anti-HDAC2 (clone Ab 16032; Abcam®, diluição 1:250).

Na análise microscópica foi avaliada a positividade nuclear de HDAC2 e HR23B nas células neoplásicas. O infiltrado linfocitário foi utilizado como controle interno em cada caso. Foi feita uma avaliação semiquantitativa desta imunopositividade através de um escore H (porcentagem de células positivas vezes a intensidade de coloração, em uma escala de 0 a 3).⁹⁷ Através deste escore H semiquantitativo (variação 0 a 300) foram realizadas comparações entre os casos para definir a correlação com a taxa de controle de doença em seis meses através de uma análise por curva ROC através do programa XLSTAT™ versão 2016.05.34949, *Long Island City*, Estados Unidos da América.

4.4. DETERMINAÇÃO DO STATUS HPV

A pesquisa imuno-histoquímica de p16 foi realizada através de anticorpo anti-p16 clone 6175-405 da marca Zeta (Gunpo-si, Coreia do Sul) em diluição 1/400. A revelação foi feita através do método *Reveal* da Spring. Consideraram-se como positivas as amostras que apresentaram imunorreatividade forte e difusa nuclear e citoplasmática em mais de 70% das células tumorais.

Foi realizada também pesquisa de HPV através de ensaio multiplex de PCR (Luminex, Austin, Estados Unidos da América) em secções de blocos de parafina contendo o tumor a ser avaliado, que havia sido fixado previamente em formalina tamponada, no Laboratório de Vírus e Câncer do Centro de Pesquisa Translacional em Oncologia do Icesp pela Profa. Dra. Laura Sichero. Após desparafinização, os cortes foram digeridos com proteinase K-SDS 1% e o DNA obtidos por extração orgânica. As reações de PCR foram conduzidas conforme descrito em Gheit et al., 2007 utilizando-se uma mistura de iniciadores específicos capazes de amplificar um fragmento do gene E7 de 18 tipos de HPV de alto-risco (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) além de 3 de baixo-risco oncogênico (6, 11 e 70).⁹⁸ Dois iniciadores para amplificação de um fragmento do gene da β-globina também foram incluídos para fornecer um controle positivo para a qualidade do DNA alvo. Os ensaios foram realizados utilizando-se 10 µL de DNA molde em volume de reação de 25 µl/poço, em placas de 96 poços. A PCR multiplex para HPV foi realizada empregando-se o *QIAGEN Multiplex PCR Kit* (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. As condições de ciclagem utilizadas na reação de PCR foram 45 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 63°C durante 3 minutos e 72°C por 90 segundos. O primeiro ciclo foi precedido por 15 minutos a 95°C e o último foi

estendido por 10 minutos a 72°C. O controle negativo consistiu na mistura de reação sem amostra. O ensaio de hibridação foi realizado de acordo com Schmitt et al.⁹⁹ Para cada sonda HPV tipo específica, os valores de *mean fluorescence intensity* obtidos quando nenhum produto de PCR foi adicionado à mistura de hibridação foram considerados como *background*. O valor de corte foi calculado adicionando 5 *mean fluorescence intensity* para 1.1X o valor do *background* mediano. Foram considerados positivos valores superiores a 20-60 *mean fluorescence intensity* a depender da sonda HPV tipo-específica.

5. RESULTADOS

5.1. DESFECHOS CLÍNICOS

Entre setembro de 2012 e junho de 2014, 14 pacientes ingressaram no estudo. Destes, três apresentaram falha de seleção (*screening*), sendo 11 incluídos e tratados. Um paciente foi retirado do estudo por piora de performance status antes de iniciar a quimiorradioterapia e um paciente foi considerado não avaliável para o objetivo primário do estudo de taxa de resposta após término de quimiorradioterapia, pela realização de tomografia sem contraste fora da janela do protocolo. Desta forma, 10 pacientes foram analisados (2).

Figura 2: Diagrama consorte da inclusão de pacientes no estudo. Um paciente foi retirado do estudo por perda de *performance status*

As características dos pacientes encontram-se resumidas na **Tabela 3**. Todos os pacientes eram do sexo masculino, com idade mediana de 55 anos e com tumores localmente avançados de orofaringe. Durante o período de inclusão do estudo não houve pacientes candidatos com tumores de cavidade oral. Todos eram atuais ou ex-tabagistas, com carga tabágica mediana de 51 maços-ano, e todos ex-etilistas. Metade dos pacientes apresentava um emagrecimento acima de 10% do peso basal dentro dos últimos seis meses da inclusão. Embora nenhum paciente tivesse apresentado tumor com expressão imuno-histoquímica positiva para p16, em três pacientes foi detectada a presença de HPV de alto risco, sendo um HPV18, um com

co-infecção de HPV16 e HPV18 e um com HPV56. As informações sobre o tratamento com QRT encontram-se resumidas na **Tabela 4**.

Tabela 3: Características dos pacientes

	N=10 (%)
Idade mediana (anos)	55 (41-65)
Sexo masculino	10 (100)
Raça	
Branca	8 (80)
Negro	2 (20)
Tabagismo	
Atual	4 (40)
Ex-tabagista	6 (60)
Carga tabágica (maços-ano)	51 (15-80)
Ex-etilismo	10 (100)
Emagrecimento	
0-10%	5 (50)
10-20%	4 (40)
>20%	1 (10)
ECOG	
0	4 (40)
1	6 (60)
Sítio primário orofaringe	10 (100)
Estádio	
III	1 (10)
IVA	8 (80)
IVB	1 (10)
Imunoexpressão de p16	
Negativa	10 (100)
HPV de alto risco	3 (30)

Tabela 4: Características dos tratamentos dos pacientes

	N=10 (%)
Doses de cisplatina	
Mediana de ciclos	2,5 (1-3)
Mediana dose (mg/m ²)	230 (100-300)
Radioterapia	
Dose 70 Gy	10 (100)
Mediana de semanas tratamento	7,4 (6,9-8,6)

Após a inclusão dos 10 primeiros pacientes, foi realizada uma análise interina de segurança. Observou-se que três pacientes haviam sido internados, sendo dois em unidade de terapia intensiva. Os motivos de internação foram insuficiência renal (relacionada a quimioterapia, não relacionada ao ácido valproico), infecção respiratória (possivelmente relacionada a quimiorradioterapia, não relacionada ao ácido valproico) e síncope em dois pacientes (relacionado à quimiorradioterapia e ao ácido valproico). Um paciente que estava sob tratamento combinado de QRT e VPA teve o VPA suspenso no momento da análise interina, dada a gravidade de eventos adversos observados. Foi realizada uma emenda no protocolo, com redução de dose do ácido valproico e da quimioterapia. As doses de VPA foram omitidas nas semanas de realização da quimioterapia e somente dois ciclos de cisplatina seriam realizados (100mg/m² d1 e d22 em concomitância a radioterapia). Foram incluídos mais dois pacientes, porém, houve uma internação, secundária a um evento adverso grau 3 (*herpes zoster* disseminado) e em outro paciente a ocorrência de radiodermite grau 4. A maioria dos pacientes apresentou ao menos um evento adverso grau 3 ou 4 (oito de nove pacientes). As demais toxicidades observadas no decorrer do estudo, nos pacientes que realizaram ao menos uma semana de QRT concomitante a VPA se encontram resumidas na **Tabela 5**.

Tabela 5: Toxicidades associadas ao tratamento

Eventos adversos	N (%)
Graus 3 e 4	8 (89)
Eventos adversos sérios	4 (44)

Evento	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Total
Anemia	4 (44)	4 (44)	1 (11)	0	9 (100)
Disgeusia	2 (22)	2 (22)	0	0	4 (44)
Elevação de creatinina	3 (33)	2 (22)	1 (11)	0	6 (67)
Emagrecimento	3 (33)	4 (44)	0	0	7 (78)
Infecção	1 (11)	2 (22)	3 (33)	0	6 (67)
Linfopenia	2 (22)	0	4 (44)	2 (22)	8 (89)
Monilíase oral	0	3 (33)	2 (22)	0	5 (56)
Mucosite	1 (11)	6 (67)	0	0	7 (78)
Náuseas	3 (33)	1 (11)	2 (22)	0	6 (67)
Neutropenia	2 (22)	0	2 (22)	0	4 (44)
Radiodermite	5 (56)	1 (11)	0	1 (12)	7 (78)
Sonolência	3 (33)	2 (22)	1 (11)	0	6 (67)
Vômitos	4 (44)	1 (11)	0	0	5 (55)
Xerostomia	5 (56)	0	0	0	5 (56)

Os dez pacientes com intenção de tratamento com QRT em combinação ao VPA receberam uma mediana de 2,5 ciclos de cisplatina, com dose mediana de 230 mg/m². Todos realizaram a dose proposta de radioterapia, com 70 Gy, em uma mediana de 7,4 semanas. A concentração plasmática mediana de VPA foi de 42 µg/mL, com 80% dos pacientes apresentando níveis plasmáticos dentro do alvo de 40 a 100 µg/mL em mais de 50% das coletas realizadas.

Quanto ao objetivo primário, em nove pacientes avaliáveis, a taxa de resposta obtida foi de 89%, sendo cinco respostas completas e três respostas parciais (**Tabela 6**). Um paciente apresentou progressão de doença. Em um seguimento mediano de 52 meses (11,2-71,9 meses), cinco pacientes falharam ao tratamento, sendo dois com progressão sistêmica. Cinco pacientes evoluíram a óbito, sendo quatro pela doença de base, um por toxicidade à quimioterapia paliativa de segunda linha. Atualmente, cinco pacientes encontram-se vivos e sem doença, com sobrevida global mediana de 44 meses.

Tabela 6: Avaliação de resposta

	N (%)
Taxa de resposta	8 (89)
Resposta completa	5 (56)
Resposta parcial	3 (33)
Progressão de doença	1 (12)
Não avaliáveis	1
Falha ao tratamento	5 (50)
Recidiva/Progressão local	4 (40)
Progressão sistêmica	2 (20)
Óbitos	5 (50)
Causa – doença	4 (40)
Causa - outros	1 (10)
Atuais vivos e sem doença	5 (50)
Seguimento mediano (meses)	52 (11,2-71,9)
Sobrevida global (meses)	44

5.2. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE VIDA

Os pacientes foram orientados a preencher os questionários de qualidade de vida por um profissional treinado e não envolvido na administração do tratamento dos pacientes. O

autopreenchimento foi realizado antes de cada consulta de forma voluntária. Três pacientes preencheram todos os questionários e a mediana de preenchimento foi de 83%. Em termos de qualidade de vida em geral, seis de oito pacientes notaram alguma melhora (diferença maior que cinco pontos)¹⁰⁰ ao final do tratamento quando comparado ao basal (**Figura 3**). Nesta avaliação, quatro pacientes também já haviam cessado o uso de analgésicos.

Figura 3: Variação de escore de qualidade de vida geral entre o status basal (antes do início do tratamento) e no momento de avaliação de resposta (6-8 semanas do término da quimiorradioterapia associada a VPA)

5.3. RESULTADOS EXPLORATÓRIOS

5.3.1. AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE HDAC2 E HR23B

Como análise exploratória, avaliou-se a expressão imuno-histoquímica de HDAC2 e HR23B através de escore H. Na **Figura 4** é possível observar os diferentes graus e de expressão imuno-histoquímica considerados.

Figura 4: Escalas de expressão imuno-histoquímica de HDAC2 e HR23b. Nas diferentes figuras (A-F) são apresentados exemplos da intensidade de expressão imuno-histoquímica de HDAC2 (A-C) e HR23B (D-F) em ordem crescente. Classificações 1+ (A e D), 2+ (B e E) e 3+ (C e F) podem ser visualizadas ao longo dos painéis. Aumento de 200 vezes

O score H mediano de HDAC2 foi 164 (80-230) e de HR23B 176,5 (95-240). Para determinar a correlação da expressão de HDAC2 e HR23B com prognóstico foi realizada uma análise por curva ROC correlacionando os níveis de expressão com a sobrevida livre de doença (SLD) em 6 meses (**Figura 5**). Por tal análise, a presença de um score H superior a 170 de expressão de HDAC2 apresentou uma acurácia de 90% em predizer a SLD em 6 meses e uma área sob a curva (AUC) de 0,958. Contudo, a avaliação do score H de HR23B não apresentou o mesmo poder discriminatório, atingindo uma acurácia de predição de SLD em 6 meses de somente 60% para escores superiores a 215.

Figura 5: Correlação da imunexpressão de HDAC2 com prognóstico. Análise por curva ROC da correlação da expressão de HDAC2 avaliado por escore H. Valores acima de 170 foram correlacionados a sobrevida livre de doença em 6 meses com sensibilidade de 83% e especificidade de 100%

5.3.2. AVALIAÇÃO DE ACETILAÇÃO DE HISTONAS EM MONÓCITOS PERIFÉRICOS

Os ensaios foram feitos em triplicata. Para o ensaio H4, as amostras foram insuficientes ou inadequadas para 2 pacientes na coleta P0 (basal), 1 paciente na coleta P1 (2 semanas de uso de VPA) e 3 pacientes na coleta P2 (término do tratamento). Além disso, cinco pacientes não realizaram a coleta de término de tratamento por progressão ou suspensão de VPA por toxicidade ou motivos de segurança. Para o ensaio H3, não foi possível realizar análise da coleta P0 para 3 pacientes. Sendo assim, realizamos a análise do efeito do VPA sobre acetilação de monócitos periféricos comparando a coleta P0 com a coleta P1. Considerando um valor de *fold change* acima de 2 como ocorrência do efeito de acetilação de histonas em monócitos periféricos, observamos que isso se deu somente em um paciente, tanto para o ensaio H4, como para o H3 (**Tabela 7**). Em 44% das coletas após duas semanas de ácido valproico realizadas para ajuste da dosagem da droga o nível sérico encontrava-se dentro do alvo desejado de 40 µg/mL.

Tabela 7: Concentração de histonas H3 e H4 acetilada (ng/mg de proteína, células mononucleares periféricas) antes (P0) e após o tratamento com VPA (P1) (n=10). “indetectável” refere-se à quantidade de indetectáveis ao método utilizado

Paciente	H4			H3		
	P0	P1	FC	P0	P1	FC
1	51.4	62.1	1.2	180.4	122.9	0.7
2	<i>Não coletado</i>	105.2	-	<i>Não coletado</i>	161.5	-
3	94.6	74.5	0.8	<i>Indetecável</i>	<i>Indetectável</i>	-
4	78.9	58.4	0.7	126.0	118.1	0.9
5	183.0	65.9	0.4	145.8	128.9	0.9
6	120.0	126.8	1.1	184.6	139.4	0.8
7	63.8	86.8	1.4	142.4	133.2	0.9
8	102.7	18.9	0.2	102.7	18.9	0.2
9	54.1	115.5	2.1	16.5	201.8	12.2
10	75.0	89.8	1.2	142.9	171.9	1.2

FC = Fold change

5.3.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MICRORNAS

A fim de determinar variações na expressão do perfil de microRNAs entre os diferentes grupos que pudessem trazer informações prognósticas e preditivas, realizaram-se as seguintes análises:

A: Pacientes pré-tratamento (P0) versus controles sadios (controle)

B: Pacientes respondedores versus não respondedores pré-tratamento (P0)

C: Pacientes pré-tratamento (P0) versus após 2 semanas de ácido valproico (P1)

D: Pacientes pré-tratamento (P0) versus pós-tratamento (8 semanas após término de QRT+VPA, P3)

E: Pacientes respondedores pré-tratamento (P0) versus pós-tratamento (P3)

F: Pacientes não-respondedores pré-tratamento (P0) versus pós-tratamento (P3)

O grupo de voluntários sadios foi composto de acompanhantes de pacientes em quimioterapia no Icesp, preferencialmente do sexo masculino e tabagista ou ex-tabagistas (**Tabela 8**).

Tabela 8: Características clínicas dos voluntários sadios

N= 7 (%)	
Idade mediana (anos)	52 (79-43)
Sexo	
Masculino	5 (71)
Feminino	2 (29)
Tabagismo	
Atual	4 (57)
Ex-tabagista	3 (43)
Carga tabágica (m.a.*)	24,5 (2,5-68)
Etilismo[¶]	4 (57)

* m.a. maços-ano; ¶ atual ou passado

Na análise A, um grande número de miRs encontram-se diferencialmente expressos entre os pacientes e controles (**Figura 6:**). Considerando um FDR de 5%, 169 miRs apresentam significância estatística com um limiar de p de 0,065. Nota-se em especial uma hipoeexpressão de uma série de miRs (**Figura 7**), muitos com funções relacionados a supressão tumoral, tais como miR-31, -222, -let-7b/e -145 (**Figura 6 e Tabela 9**).

Figura 6: Análise BUM da comparação da expressão de miRs entre os pacientes pré-tratamento e controles sadios

Figura 7: Representação gráfica através de *heatmap* (mapa de calor) de análise de cluster hierárquico da expressão de miRs selecionados segundo menores valores de p ($n=43$, correlação por Pearson) de pacientes (colunas, barra superior cinza) e controles sadios (colunas, barra superior preta)

Figura 8: Níveis de expressão de miRs entre pacientes pré-tratamento (P0) e controles saudáveis. Comparação entre grupos através de teste t

Tabela 9: Principais alvos validados relacionados a carcinogênese de miRs desregulados em pacientes com CECp

miR	Alvos relacionados a carcinogênese
miR-31	TP53, FOXP3, RET, ARF1, MET ^{101,102}
miR-let-7b	Regulação por Myc ¹⁰³
miR-222	TP53 ¹⁰⁴
miR-145	CCND2, NTRK2, HDAC2, EGFR, TGFB, VEGFA, CDK6 ¹⁰⁵

Na análise B, com uma FDR de 5%, 19 miRs são diferencialmente expressos de forma significativa, conforme demonstrado na **Tabela 10**.

Tabela 10: Níveis de expressão medianos de miRs diferencialmente expressos entre respondedores e não respondedores

Sonda	p	<i>Fold Change</i>	Não respondedores	Respondedores
hsa-miR-200b	0.002	49.68	-11.71	-6.08
hsa-miR-301b	0.003	104.04	-11.67	-4.97
hsa-miR-103	0.004	1069.10	-9.09	0.97
hsa-miR-374b	0.004	2985.93	-9.64	1.90
hsa-miR-205	0.006	45.74	-11.69	-6.17
hsa-miR-296	0.006	44.55	-10.04	-4.56
hsa-miR-335	0.006	439.41	-9.31	-0.53
hsa-miR-590	0.007	176.74	-9.86	-2.39
hsa-let-7a	0.007	132.09	-8.31	-1.27
hsa-miR-195	0.008	34.91	-4.15	0.98
hsa-miR-32	0.009	28.44	-11.69	-6.86
hsa-miR-134	0.010	70.60	-11.47	-5.32
hsa-miR-660	0.010	142.88	-7.37	-0.21
hsa-miR-19a	0.012	59.42	-3.98	1.92
hsa-miR-574	0.012	505.45	-9.27	-0.29
hsa-miR-320	0.013	35.99	-1.38	3.79
hsa-miR-135a	0.013	27.36	-11.63	-6.85
hsa-miR-17	0.014	41.06	0.34	5.70
hsa-miR-20a	0.015	20.20	0.38	4.72

Em uma análise por cluster hierárquico de duas vias, nota-se que há alguma separação entre estes grupos (**Figura 9**).

Figura 9: Representação gráfica através de *heatmap* (mapa de calor) de análise de cluster hierárquico da expressão de miRs (correlação por Pearson) de respondedores (colunas, barra inferior preta) e não respondedores (colunas, barra inferior cinza).

As demais análises de C a F não revelaram expressão distinta de miRs com significância estatística.

5.3.4. VALIDAÇÃO DE MICRORNAS EM PLASMA

Através de anotação e análise de miRs diferencialmente expressos entre os grupos analisados na seção anterior, selecionaram-se microRNAs para validação em plasma. Foram realizadas comparações da mediana de expressão de miRs no plasma nos diferentes grupos. Valores de leitura indeterminados foram excluídos desta análise. As diferentes comparações encontram-se nas tabelas a seguir.

Tabela 11: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo

	Controle mediana (N)	P0 mediana (N)	P1 mediana (N)	P3 mediana (N)	P
miR-1-3p	0,25 (7)	10,73 (11)	11,66 (11)	20,87 (10)	0,001
miR-let-7a-5p	1,62 (7)	4,09 (11)	4,54 (11)	3,52 (10)	0,13
miR-let-7e-5p	0,67 (7)	11,66 (11)	9,47 (11)	13,40 (10)	0,003
miR-17-5p	2,30 (7)	1,00 (11)	2,06 (11)	1,87 (9)	0,77
miR-19a-3p	1,54 (7)	1,90 (11)	0,90 (10)	1,07 (7)	0,40
miR-31-5p	2,91 (7)	18,04 (11)	23,64 (11)	73,11 (10)	0,11
miR-32-5p	0,39 (7)	0,60 (7)	0,18 (7)	0,11 (4)	0,13
miR-99a-5p	2,31 (6)	5,48 (6)	14,35 (5)	3,42 (6)	0,19
miR-200b-3p	0,86 (6)	5,04 (9)	4,70 (6)	18,63 (6)	0,20
miR-215-5p	8,06 (6)	16,01 (6)	3,49 (5)	15,71 (5)	0,32
miR-331-3p	4,67 (7)	12,64 (10)	13,96 (9)	6,50 (4)	0,34
miR-374b-5p	0,88 (7)	0,84 (11)	0,46 (11)	0,51 (10)	0,37
miR-660-5p	4,18 (7)	5,87(11)	3,15 (10)	7,16 (6)	0,73

Controle – voluntários saudáveis, P0 - Amostras de pacientes coletadas antes do início o tratamento, P1 - Amostras coletadas após tratamento com VPA por 2 semanas, P3- Amostras coletadas após 8 semanas do término do tratamento QRT+VPA. P- valor estatístico determinado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, N – número de pacientes.

Tabela 12: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo

	Controle mediana (N)	P0 mediana (N)	P
miR-1-3p	0,25 (7)	10,73 (11)	<0,001
miR-let-7a-5p	1,62 (7)	4,09 (11)	0,03
miR-let-7e-5p	0,67 (7)	11,66 (11)	0,001
miR-17-5p	2,30 (7)	1,00 (11)	0,33
miR-19a-3p	1,54 (7)	1,90 (11)	0,79
miR-31-5p	2,91 (7)	18,04 (11)	0,02
miR-32-5p	0,39 (7)	0,60 (7)	0,62
miR-99a-5p	2,31 (6)	5,48 (6)	0,23
miR-200b-3p	0,86 (6)	5,04 (9)	0,05
miR-215-5p	8,06 (6)	16,01 (6)	0,59
miR-331-3p	4,67 (7)	12,64 (10)	0,27
miR-374b-5p	0,88 (7)	0,84 (11)	0,79
miR-660-5p	4,18 (7)	5,87(11)	0,66

Controle – voluntários sadios, P0 -Amostras coletadas antes do início do tratamento, P- valor estatístico determinado pelo teste de *Mann-Whitney*, N – número de pacientes.

Tabela 13: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo

	P0 (N)	P1 (N)	P
miR-1-3p	10,73 (11)	11,66 (11)	1,0
miR-let-7a-5p	4,09 (11)	4,54 (11)	0,80
miR-let-7e-5p	11,66 (11)	9,47 (11)	0,79
miR-17-5p	1,00 (11)	2,06 (11)	0,48
miR-19a-3p	1,90 (11)	0,90 (10)	0,10
miR-31-5p	18,04 (11)	23,64 (11)	0,70
miR-32-5p	0,60 (7)	0,18 (7)	0,21
miR-99a-5p	5,48 (6)	14,35 (5)	0,76
miR-200b-3p	5,04 (9)	4,70 (6)	1,0
miR-215-5p	16,01 (6)	3,49 (5)	0,25
miR-331-3p	12,64 (10)	13,96 (9)	0,97
miR-374b-5p	0,84 (11)	0,46 (11)	0,24
miR-660-5p	5,87(11)	3,15 (10)	0,97

P0 -Amostras de pacientes coletadas antes do início do tratamento, P1 - Amostras coletadas após tratamento com VPA por 2 semanas, *P*- valor estatístico determinado pelo teste de *Mann-Whitney*, N –número de pacientes.

Tabela 14: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo

	P0 (N)	P3 (N)	P
miR-1-3p	10,73 (11)	20,87 (10)	0,37
miR-let-7a-5p	4,09 (11)	3,52 (10)	0,71
miR-let-7e-5p	11,66 (11)	13,40 (10)	0,56
miR-17-5p	1,00 (11)	1,87 (9)	0,83
miR-19a-3p	1,90 (11)	1,07 (7)	0,43
miR-31-5p	18,04 (11)	73,11 (10)	0,61
miR-32-5p	0,60 (7)	0,11 (4)	0,16
miR-99a-5p	5,48 (6)	3,42 (6)	0,95
miR-200b-3p	5,04 (9)	18,63 (6)	0,78
miR-215-5p	16,01 (6)	15,71 (5)	1,0
miR-331-3p	12,64 (10)	6,50 (4)	0,30
miR-374b-5p	0,84 (11)	0,51 (10)	0,61
miR-660-5p	5,87(11)	7,16 (6)	0,53

P0 -Amostras de pacientes coletadas antes do início do tratamento; P3- Amostras coletadas após 8 semanas do término tratamento QRT+VPA. *P*- valor estatístico determinado pelo teste de *Mann-Whitney*, N –número de pacientes.

Tabela 15: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em plasma, de acordo com cada um dos grupos de estudo

	P0 NR mediana (N)	P0-R mediana (N)	P
miR-1-3p	30,34 (5)	10,20 (6)	0,43
miR-let-7a-5p	3,61 (5)	5,34 (6)	0,54
miR-let-7e-5p	15,17 (5)	8,44 (6)	0,66
miR-17-5p	3,61 (5)	0,89 (6)	0,18
miR-19a-3p	2,09 (5)	1,45 (6)	0,66
miR-31-5p	43,51 (5)	11,07 (6)	0,25
miR-32-5p	0,92 (2)	0,15 (5)	0,57
miR-99a-5p	45,40 (2)	5,48 (5)	0,57
miR-200b-3p	33,40 (4)	5,04 (5)	0,73
miR-215-5p	0,03 (1)	23,00 (5)	0,33
miR-331-3p	15,73 (4)	12,64 (6)	0,61
miR-374b-5p	0,84 (5)	0,78 (6)	0,79
miR-660-5p	5,87 (5)	4,68 (6)	0,93

P0 -Amostras de pacientes coletadas antes do início do tratamento; NR: não respondedores, R: respondedores. P- valor estatístico determinado pelo teste de *Mann-Whitney*, N –número de pacientes.

5.3.5. VALIDAÇÃO DE MICRORNAS EM SALIVA

Os miRs que se apresentaram diferencialmente expressos na análise de RT-PCR foram então analisados em saliva dos diferentes grupos previamente descritos (pacientes nos diferentes momentos do tratamento e voluntários sadios), a fim de se determinar se a alteração observada no plasma seria também detectada em saliva. A coleta no momento da reavaliação de resposta não foi possível na maioria dos pacientes devido à intensa xerostomia. Dessa forma, o comparativo com o final do tratamento não foi realizado. Observou-se que, assim como na análise de perfil de miRs através do TLDA o miR-let-7-e também se encontrava hipoexpresso nos pacientes em relação aos controles (**tabela 17 e Figura 10**).

Tabela 16: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em saliva, de acordo com cada um dos grupos de estudo

	Controle mediana (N)	P0 mediana (N)	P1 mediana (N)	<i>P</i>
miR-1-3p	4,57 (8)	3,29 (11)	0,89 (11)	0,02
miR-let-7a-5p	1,05 (8)	0,69 (11)	0,42 (11)	0,006
miR-let-7e-5p	5,28 (5)	1,64 (11)	1,47 (11)	0,035
miR-32-5p	0,04 (3)	0,67 (7)	0,14 (8)	0,13
miR-660-5p	0,66 (8)	0,91(11)	0,39 (11)	0,35

Controle – voluntários sadios, P0 -Amostras de pacientes coletadas antes do início do tratamento, P1 - Amostras coletadas após tratamento com VPA por 2 semanas, *P*- valor estatístico determinado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, N –número de pacientes.

Tabela 17: Expressão mediana dos microRNAs escolhidos para validação por qPCR, em saliva, de acordo com cada um dos grupos de estudo

	Controle mediana (N)	Grupo 1 mediana (N)	<i>P</i>
miR-1-3p	4,57 (8)	3,29 (11)	0,90
miR-let-7a-5p	1,05 (8)	0,69 (11)	0,05
miR-let-7e-5p	5,28 (5)	1,64 (11)	0,04
miR-32-5p	0,04 (3)	0,67 (7)	0,32
miR-660-5p	0,66 (8)	0,91(11)	0,90

Controle – voluntários sadios, P0 -Amostras de pacientes coletadas antes do início do tratamento, P1 - Amostras coletadas após tratamento com VPA por 2 semanas, *P*- valor estatístico determinado pelo teste de *Kruskal-Wallis*, N –número de pacientes.

Figura 10: Teste t comparando a expressão de miR-let-7e e miR-let-7a em controles e pacientes ao início do tratamento através da avaliação do perfil de miRs em plasma por TLDA.

5.3.6. ENSAIOS FUNCIONAIS COM EXOSSOMOS

Inicialmente foi realizada curva de concentração de cisplatina para determinação da concentração inibitória para 50% das células (IC₅₀) para cada linhagem (**Figura 111**). A partir dos resultados foram escolhidas para realização dos demais ensaios funcionais, as seguintes doses e tempos: SCC-4 e SCC-25; 20 μ M e 24 horas de tratamento. Para a linhagem SCC-9 a dose próxima de IC 50 foi de 50 μ M em 48 horas de tratamento.

Figura 11: Ensaio MTT em linhagens celulares de cabeça e pescoço. Concentrações crescentes de cisplatina foram testadas para determinação da dose de IC50. As linhagens SCC-4 e SCC-25 apresentaram uma viabilidade em torno de 60% com a dose de 20 μ M em 24 horas de tratamento e a linhagem SCC-9, 52% de viabilidade com a dose de 50 μ M, por 48 horas de tratamento. Foram realizados 3 ensaios independentes, em triplicata, para SCC-24 e para as demais, 2 ensaios. Os dados estão expressos em porcentagem em relação à célula controle, ou seja, a que não recebeu cisplatina

Conforme descrito na metodologia, avaliou-se o impacto da citotoxicidade da cisplatina em linhagens celulares conforme o acréscimo de exossomos advindos de voluntários sadios (VS), plasma basal de pacientes respondedores (P0-R), plasma basal de pacientes não respondedores (P0-NR), após duas semanas de ácido valproico (P1) e ao término do tratamento com QRT+VPA (P3). Como demonstrado na representação gráfica da

Figura 122 não houve diferenças significativas entre os diferentes cenários em ensaio de MTT em duas linhagens (SCC-4 e SCC-25). Contudo, o ensaio de migração celular com a linhagem SCC-9 demonstrou uma maior taxa de migração celular com o acréscimo de vesículas de não respondedores após 2 semanas de VPA comparado ao controle ($p < 0.001$) (**figura 13**).

Figura 12: Ensaio MTT em linhagens celulares de cabeça e pescoço. O acréscimo de exossomos não teve impacto significativo na citotoxicidade à cisplatina avaliada com 24h de tratamento em ensaios independentes, para linhagens SCC-4, SCC-9 e SCC-25. CTR: controle; VS: voluntário sadio; P0-R: paciente pré-tratamento respondedor; P0-NR: paciente pré-tratamento não respondedor

Figura 13: Avaliação de migração celular ao longo do tempo. Para a linhagem celular SCC-9 observou-se um incremento na taxa de migração celular com o acréscimo de exossomos derivados de pacientes não respondedores após duas semanas de ácido valproico (P1-NR) em comparação ao controle (sem acréscimo de exossomos). Teste-t, $p < 0.001$. As linhas contínuas representam o grupo não respondedor e as linhas tracejadas os respondedores. As demais diferenças observadas não apresentaram significância estatística

6. DISCUSSÃO

A regulação epigenética é considerada crucial na carcinogênese e na progressão do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Os níveis de regulação epigenética de expressão gênica incluem microRNAs e modificações epigenéticas de histonas, entre outras alterações observadas no câncer.

Neste estudo clínico a hipótese de trabalho incluiu o uso de um inibidor de histona deacetilase, ácido valproico, associado ao tratamento padrão de quimiorradioterapia baseado em cisplatina em pacientes com carcinoma epidermoide de orofaringe localmente avançado, a fim de melhorar a eficácia deste tratamento. Do ponto de vista clínico, é fundamental que novas estratégias de tratamento sejam investigadas no cenário da pesquisa clínica para melhorar os resultados dos tratamentos atualmente oferecidos a esta população. Apesar de intensos estudos para incorporação de tratamentos neoadjuvantes, esquemas alternativos de fracionamento da radioterapia, uso de terapias de alvo molecular e incorporação de imunoterapia, notam-se ganhos muito pequenos na eficácia da quimiorradiação baseada em cisplatina. Sendo assim, tratamentos inovadores e acessíveis fazem-se necessários.

A população estudada foi representativa desse grupo de pacientes, todos homens, tabagistas ou ex-tabagistas e somente três de 11 pacientes com pesquisa positiva para HPV de alto risco. Este é o retrato do paciente portador de câncer de orofaringe e cavidade oral no Brasil, composto infelizmente majoritariamente por pacientes em estádios avançados. Isto corrobora para os resultados desapontadores de controle da doença em longo prazo: somente 30% são curados em 3-5 anos^{5,90}.

Buscando uma melhora nos resultados do tratamento padrão de quimiorradioterapia baseada em cisplatina para pacientes com doença localmente avançada, estudamos a associação do ácido valproico. Além da questão da ação como regulador epigenéticos, trata-se de droga acessível e já disponível na rede pública de atendimento à saúde. Infelizmente observamos um inesperado excesso de toxicidades relacionado a associação do VPA ao tratamento padrão, previamente não descrito na literatura à época da concepção deste estudo, que impediu a continuidade do recrutamento até o número inicialmente previsto. Contudo, manteve-se alta taxa de resposta, sendo o objetivo da primeira fase atingido (com oito respostas parciais). A sobrevida global mediana foi de 44 meses e tampouco foi observado prejuízo na qualidade de vida avaliada pelos questionários EORTC QLQ-C30 e HN35. Alinhado a esses resultados, Teknos et al descreveram uma alta taxa de resposta com a associação do iHDAC

vorinostat à quimiorradioterapia, embora associado, assim como neste trabalho, à elevada toxicidade com 65% dos pacientes apresentando linfopenia graus 3 e 4.¹⁰⁶

De forma exploratória, observou-se a elevada imunoexpressão de HDAC2 e HR23B nos tumores analisados. Inclusive, observou-se correlação prognóstica de altos níveis de expressão de HDAC2 e sobrevida livre de doença em seis meses. Todos os pacientes participantes do estudo eram tabagistas, ou ex-tabagistas, o que segundo Chang et al.⁸⁷, explica a alta expressão de HDAC2 neste presente trabalho. A alta expressão desta proteína ajuda a compreender o fenótipo agressivo dos cânceres de orofaringe induzidos pelo tabagismo, inclusive correlacionando-se com marcadores de agressividade. No trabalho de Zhao et al.¹⁰⁷, em uma amostra de 260 pacientes com câncer de mama, 57,5 % (130) apresentaram marcação positiva para HDAC, com escore H médio de 175. Assim, tal valor corrobora os resultados obtidos neste presente trabalho, visto que o escore H médio foi de 156, sendo a positividade considerada para escores superiores a 100.

Além disso, verificamos alta marcação nuclear e citoplasmática de HR23B, o qual tem papel importante na ubiquitinação de HDAC2 e sua degradação via proteassoma. Espera-se que haja então um balanço entre o papel regulatório de HR23B (favorável) e de HDAC2 (desfavorável) em termos de regulação epigenética da transcrição.¹⁰⁸ Ainda em estudos como de Olofsson et al.¹⁰⁹, e Kabjorn Gustafsson et al.¹¹⁰, demonstrou-se que a proteína HR23B também está associada com altas taxas de expressão das proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs) CDKN2A e CDKN1B o que levaria a célula ao estado senil precoce, e, consequentemente à apoptose. Realmente verificamos que no seguimento destes pacientes, entre aqueles cinco vivos no último contato, quatro apresentam escore H de expressão de HR23B superior a 150 e apenas um inferior a 150, sublinhando o potencial papel prognóstico positivo deste biomarcador.

De forma exploratória, realizou-se a avaliação de acetilação de monócitos periféricos. Porém, esta não foi informativa, a despeito de nível sérico terapêutico de ácido valproico, com valor médio de 54,36 g/ml. Alinhado a estes achados, evidências apontam que, apesar do efeito terapêutico de inibição da deacetilação das histonas pelo ácido valproico em células tumorais, este não é detectado através da mensuração de inibição de atividade de histonas deacetilases. Uma possibilidade é a ação majoritária de VPA sob HDAC2.⁴⁶ Adicionalmente, estudos prévios demonstraram que a metodologia empregada pode influenciar a avaliação de acetilação de monócitos periféricos neste contexto, uma vez que o uso de imunofluorescência ou *Western*

Blot demonstraram melhores resultados na avaliação deste efeito biológico. Além disso, é importante ressaltar que a acetilação de monócitos periféricos não demonstrou ser um preditor de resposta clínica e, portanto, tais dados devem ser interpretados com cautela.

Quanto ao perfil de miRs inibitórios foram identificados um grande número de miRs diferencialmente expressos entre pacientes e controles tabagistas sem câncer. Fica claro, portanto, que o papel regulatório de miRs é perdido na progressão tumoral. Alguns miRs aqui estudados (miRs -31, -let-7b/e, -222, -145) têm como alvo genes que se encontram desregulados, seja por mutação ou alterações epigenéticas (metilação de promotor, por exemplo), em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço relacionado ao tabaco e ao álcool, incluindo TP53, MET, CCND2, EGFR, TGF β , CDK6 e VEGFA, como mostrado acima.¹⁰¹⁻¹⁰⁵ Pudemos mostrar que estes miRs regulatórios podem ser agrupados em um perfil como mostrado na **figura 7**. Da mesma forma, pudemos identificar um conjunto de 19 miRs diferencialmente expressos no plasma de respondedores e não respondedores ao tratamento aqui avaliado, que puderam ser agrupados. Trata-se de uma evidência preliminar que os tumores que se encaixem nesse perfil de miRs aqui mostrados ao diagnóstico podem ser responsivos (ou não) ao tratamento de quimiorradiação proposto, hipótese que precisa ser testada para validação deste biomarcador em um grupo maior de pacientes.

Ainda à procura de uma explicação dos mecanismos subjacentes a esses achados, ensaios funcionais de vesículas extracelulares, sabidamente carreadoras de miRs, isoladas do plasma foram realizados. A adição destas vesículas não teve impacto em ensaios de avaliação de citotoxicidade da cisplatina em duas culturas celulares (SCC-9 e SCC-25). Contudo, os ensaios de migração celular com SCC-9 demonstraram um aumento da taxa de migração celular após a adição de vesículas derivadas de pacientes não respondedores após duas semanas de ácido valproico comparado ao controle, sugerindo uma possível maior agressividade destes tumores, mediada pela expressão de miRs.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados aqui observados podemos concluir que a adição de ácido valproico ao tratamento de quimiorradiação concomitante baseada em cisplatina foi tóxica e não deve ser recomendada neste grupo de pacientes. Entretanto, demonstrou-se um aumento da taxa de resposta desta associação, conforme o objetivo primário do estudo, com uma sobrevida global mediana de 44 meses. A aplicação de questionário de qualidade de vida foi realizada, e a despeito das toxicidades aqui caracterizadas, foi possível quantificar um incremento de escore de qualidade de vida geral. Dado o número de pacientes, não foi possível realizar um comparativo entre os subgrupos HPV positivos e negativos, conforme planejado inicialmente. Além disso, A modulação de atividade de HDAC2 pelo ácido valproico, neste cenário, não foi comprovada através da metodologia empregada. O valor prognóstico da expressão imuno-histoquímica da HDAC2 em pacientes submetidos a tratamento com o inibidor de deacetilação de histonas ácido valproico foi avaliado, havendo uma correlação entre maior expressão de HDAC2 e maior sobrevida livre de progressão em seis meses. Observou-se com clareza o distinto perfil de expressão de miRs entre pacientes e voluntários saudáveis, reforçando a possibilidade do uso destes marcadores como futura ferramenta diagnóstica. Além disso, demonstrou-se a menor expressão de miR-let-7a/e em saliva de pacientes comparado aos voluntários saudáveis, salientando o papel da perda de miRs supressores de tumor e que podem ser facilmente avaliados em paciente, através de fluido biológico que não implica uma desconfortável coleta sanguínea. A despeito destes diferentes níveis de expressão de miRs vesículas extracelulares não modificaram a citotoxicidade de cisplatina em culturas celulares. Porém, um aumento na taxa de migração celular em uma linhagem foi observado. Pudemos caracterizar um conjunto de miRs relacionados à melhor resposta ao tratamento.

Apesar do papel relevante no controle da expressão gênica, a modulação epigenética ainda apresenta uma série de desafios para ser implementada na prática, estando justificada somente em cenários muito específicos, como no tratamento de linfomas de células T. Estudos futuros como a combinação de Imunoterapia a inibidores de deacetilação de histonas¹¹¹ podem ser uma forma de se avaliar a incorporação destes agentes no tratamento dos cânceres de cabeça e pescoço com menor toxicidade.

8. ANEXOS

Anexo I: Tabela de atividades do estudo	Triagem (2sem)	Início Estudo	Pré QRT	Fase de tratamento								Seguimento pós tratamento		
Semana	1	2 (VPAi)	3	4 (QRTi)	5	6	7	8	9	10	11	17-19	Aval Mensal*	37- 39**
Critérios elegibilidade	X	X												
Avaliação Médica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
História Clínica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EF, P, Alt, Sinais Vitais	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Performance Status	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação Nutricional (>20% 6m à nutrição/SNE)	X													
Medicações concomitantes	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HMG, U, Cr, Na, K, Mg, Cai, PTF, BTF, TGO, TGP, GGT, FA	X		X				X			X		X	SN	X
BHCG Mulheres < 50a	X													
Sorologias (HBV, HCV, HIV) se ativo	X													
TSH												X		X
Tomografia de face e pescoço (até 6 sem antes V1)	X											X		X
Laringoscopia (até 6 sem antes V1)	X											X		X
Imagem tórax	X													
ECG	X													
Patologia (HPV, HR23B, HDAC2)	X													
Encaminhar radioterapia	X													
Encaminhar Odonto	X													
Assinar TCLE	X													
VPA NS 40-100 µg/mL, 15mg/kg/d		X	X	X	X	X	X	X	X	X	FIM			
NS VPA			X	X			X			X				
Acetilação de Histonas SP		X		X							X			
Coleta mIRs														
plasma		X		X								X		
saliva		X		X								X		
EORTC QLQ HN35 + QLQ C30		X		X			X			X		X		X
Cisplatina 100mg/m2				X			X			X				
Radioterapia				X	X	X	X	X	X	X	FIM			
Relato SAE/AE			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação CCP	X											X		X

* Até o 3º mês, retorno no 6º mês (semana 37 a 39)

** Após 3 meses, seguimento habitual (Protocolo Icesp)

Anexo II: Questionários de qualidade vida EORTC QLQ C30 e QLQ HN35

BRAZILIAN

EORTC QLQ-C30 (versão 3.0.)

Nós estamos interessados em alguns dados sobre você e sua saúde. Responda, por favor, a todas as perguntas fazendo um círculo no número que melhor se aplica a você. Não há respostas certas ou erradas. A informação que você fornecer permanecerá estritamente confidencial.

Por favor, preencha suas iniciais:

--	--	--	--	--

Sua data de nascimento (dia, mês, ano):

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Data de hoje (dia, mês, ano):

31

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	Não	Pouco	Modera- damente	Muito
1. Você tem qualquer dificuldade quando faz grandes esforços, por exemplo carregar uma bolsa de compras pesada ou uma mala?	1	2	3	4
2. Você tem qualquer dificuldade quando faz uma <u>longa</u> caminhada?	1	2	3	4
3. Você tem qualquer dificuldade quando faz uma <u>curta</u> caminhada fora de casa?	1	2	3	4
4. Você tem que ficar numa cama ou na cadeira durante o dia?	1	2	3	4
5. Você precisa de ajuda para se alimentar, se vestir, se lavar ou usar o banheiro?	1	2	3	4

Durante a última semana:

	Não	Pouco	Modera- damente	Muito
6. Tem sido difícil fazer suas atividades diárias?	1	2	3	4
7. Tem sido difícil ter atividades de divertimento ou lazer?	1	2	3	4
8. Você teve falta de ar?	1	2	3	4
9. Você tem tido dor?	1	2	3	4
10. Você precisou repousar?	1	2	3	4
11. Você tem tido problemas para dormir?	1	2	3	4
12. Você tem se sentido fraco/a?	1	2	3	4
13. Você tem tido falta de apetite?	1	2	3	4
14. Você tem se sentido enjoado/a?	1	2	3	4
15. Você tem vomitado?	1	2	3	4

Por favor, passe à página seguinte

BRAZILIAN

Durante a última semana:	Não	Pouco	Moderadamente	Muito
16. Você tem tido prisão de ventre?	1	2	3	4
17. Você tem tido diarreia?	1	2	3	4
18. Você esteve cansado/a?	1	2	3	4
19. A dor interferiu em suas atividades diárias?	1	2	3	4
20. Você tem tido dificuldade para se concentrar em coisas, como ler jornal ou ver televisão?	1	2	3	4
21. Você se sentiu nervoso/a?	1	2	3	4
22. Você esteve preocupado/a?	1	2	3	4
23. Você se sentiu irritado/a facilmente?	1	2	3	4
24. Você se sentiu deprimido/a?	1	2	3	4
25. Você tem tido dificuldade de se lembrar das coisas?	1	2	3	4
26. A sua condição física ou o tratamento médico tem interferido em sua vida <u>familiar</u> ?	1	2	3	4
27. A sua condição física ou o tratamento médico tem interferido em suas atividades <u>sociais</u> ?	1	2	3	4
28. A sua condição física ou o tratamento médico tem lhe trazido dificuldades financeiras?	1	2	3	4

Para as seguintes perguntas, por favor, faça um círculo em volta do número entre 1 e 7 que melhor se aplica a você.

29. Como você classificaria a sua saúde em geral, durante a última semana?

1	2	3	4	5	6	7
Péssima						Ótima

30. Como você classificaria a sua qualidade de vida geral, durante a última semana?

1	2	3	4	5	6	7
Péssima						Ótima

EORTC QLQ – H&N35

Às vezes os pacientes relatam que possuem alguns sintomas ou problemas referentes a sua enfermidade ou tratamento. Por favor, indique em que medida você sentiu estes sintomas ou problemas durante a semana passada. Por favor, assinale com um círculo o que corresponde mais adequadamente ao seu caso.

Durante a semana passada:	Não	Pouco	Moderado	Muito
31. Você teve dores na sua boca?	1	2	3	4
32. Você teve dor no maxilar superior (parte superior da boca) ou inferior (queixo)?	1	2	3	4
33. Tem ocorrido alguma irritação em sua boca?	1	2	3	4
34. Você tem tido dor em sua garganta?	1	2	3	4
35. Você teve dificuldade em engolir líquidos?	1	2	3	4
36. Você teve dificuldade em engolir alimentos pastosos (ex. purê de batatas)?	1	2	3	4
37. Você teve dificuldade em engolir alimentos sólidos (ex. arroz, carne)?	1	2	3	4
38. Ao engolir, você tem engasgado?	1	2	3	4
39. Houve algum problema com seus dentes?	1	2	3	4
40. É difícil abrir a boca?	1	2	3	4
41. Você tem sentido sua boca seca?	1	2	3	4
42. A saliva era de consistência pegajosa?	1	2	3	4
43. Você teve dificuldades em sentir os cheiros?	1	2	3	4
44. Você teve dificuldades em sentir o sabor dos alimentos?	1	2	3	4
45. Você tem tido tosse?	1	2	3	4
46. Esteve rouco?	1	2	3	4
47. Você tem se sentido doente?	1	2	3	4
48. Em relação a sua aparência, você tem se preocupado com a sua condição física?	1	2	3	4

Por favor, passe à página seguinte

Durante a semana passada:	Não	Pouco	Moderado	Muito
49. Você teve dificuldade em se alimentar?	1	2	3	4
50. Você teve dificuldade em se alimentar à frente da sua família?	1	2	3	4
51. Você teve dificuldade em se alimentar à frente de outras pessoas?	1	2	3	4
52. Você teve dificuldade em ter prazer em suas refeições?	1	2	3	4
53. Você teve dificuldade em falar com outras pessoas?	1	2	3	4
54. Você teve dificuldade em falar ao telefone?	1	2	3	4
55. Você encontrou dificuldades no convívio com sua família?	1	2	3	4
56. Você encontrou dificuldades no convívio com seu amigos?	1	2	3	4
57. Você teve dificuldade em estar presente em lugares públicos?	1	2	3	4
58. Você encontrou alguma dificuldade em ter contato pessoal com sua família ou amigos?	1	2	3	4
59. Você tem sentido menos interesse sexual?	1	2	3	4
60. Você teve menos prazer sexual?	1	2	3	4

Durante a semana passada:	Não	Sim
61. Você tomou algum medicamento para as dores?	1	2
62. Tomou algum suplemento alimentar (excluindo vitaminas)?	1	2
63. Alimentou-se através de sonda?	1	2
64. Você perdeu peso?	1	2
65. Você ganhou peso?	1	2

Anexo III: Aprovação comitê de ética **APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **09/11/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **327/11** intitulado: **“AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE ÁCIDO VALPRÓICO COMBINADO AO TRATAMENTO PADRÃO DE QUIMIOTERAPIA CONCOMITANTE BASEADA EM CISPLATINA, EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO LOCALMENTE AVANÇADO.”** apresentado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo “Octávio Frias de Oliveira”.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Igor Moisés Longo Snitcovsky
Gilberto de Castro Junior

Pesquisador (a) Executante: Milena Perez Mak

CEP-FMUSP, 09 de Novembro de 2011.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador interino
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

Anexo IV: Termo de consentimento livre e esclarecido: Pacientes**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

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 (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .. **AValiação de eficácia de ácido valpróico combinado ao tratamento padrão de quimiorradioterapia concomitante baseada em cisplatina, em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localmente avançado**

PESQUISADOR : Milena Perez Mak.....

CARGO/FUNÇÃO: Médica Oncologia Clínica..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .125006

UNIDADE: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Octavio Frias de Oliveira" - ICESP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☒RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses.....

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

Este termo contém as informações referentes ao estudo para você decidir sua participação voluntária ou não deste estudo. Caso você aceite participar deste estudo, estará livre para se retirar em qualquer momento. Se optar por não participar, seu tratamento continuará normalmente.

Você foi diagnosticado com um Câncer de Cabeça e Pescoço localmente avançado primário de Orofaringe ou Cavidade Oral e que foi considerado irressecável pelo cirurgião de cabeça e pescoço. Nessa situação o tratamento padrão é com quimioterapia com uma medicação chamada cisplatina associada à radioterapia. Este tratamento é feito neste hospital e em todo o mundo, de acordo com as pesquisas internacionais. Na maioria dos casos a doença é controlada, mas infelizmente existe uma chance da doença retornar ou aumentar. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar se há melhora do resultado do tratamento convencional com quimiorradioterapia quando há associação de ácido valproico. O ácido valproico é um anticonvulsivante, já com uso consagrado na prática clínica no tratamento de epilepsia e transtorno bipolar. Há estudos publicados do uso desse medicamento em pacientes com neoplasias sólidas e hematológicas mostrando alguma benefício do medicamento.

Outras questões que serão avaliadas são a toxicidade a esse tratamento combinado, bem como a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global.

Este protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital, que é regulado pela legislação nacional para garantir a proteção dos voluntários.

2 – Procedimentos que serão realizados

Após leitura e consentimento para participação do estudo, serão realizados exames para determinar a elegibilidade ao tratamento proposto. Após a consulta inicial do estudo, na qual será feita a história e seu exame físico, você será submetido a:

- Exames laboratoriais com Hemograma e bioquímica; incluindo testes de função do fígado e dos rins.
- Tomografia computadorizada de pescoço e face para avaliar a extensão da doença
- Radiografia de tórax pósterio-anterior e perfil para avaliar a extensão da doença
- Avaliação com nutricionista; em caso de perda ponderal superior a 20% nos últimos 6 meses será iniciada suplementação e considerada alimentação enteral
- Eletrocardiograma para avaliar possível contraindicação ao uso de ácido valproico
- Avaliação odontológica antes da radioterapia

- Mulheres com idade inferior a 50 anos serão submetidas a dosagem de betaHCG para excluir gravidez.
- Coleta de sangue para Hepatite B, C ou HIV ativos pelo uso de ácido valproico
- Na amostra do diagnóstico do tumor serão feitos testes de imuno-histoquímica para avaliar a etiologia do tumor (pesquisa do vírus HPV) e fatores de resposta ao uso do ácido valproico (HDAC2 e HR23B).

O ácido valproico será administrado por via oral, com ajuste de dose através do nível sérico observado por coleta de sangue. Após duas semanas de uso, será iniciada a quimiorradioterapia padrão do Instituto. Quando houver o término da quimiorradioterapia o ácido valproico será suspenso.

A quimioterapia consiste em uma medicação chamada cisplatina, que será feita por via intravenosa no primeiro, 22º e 43º dia da radioterapia. Antes de cada sessão de quimioterapia, um tratamento preventivo (pré-medicação) contra os vômitos será administrado também por via intravenosa, consistindo em dexametasona ou análogo e ondansetron ou análogo. Também será feito um soro de hidratação com eletrólitos para proteger a função renal. Estes cuidados são rotineiros com esse tipo de quimioterapia.

A radioterapia é um tratamento à base de uma radiação localizada no seu tumor, sendo feito um planejamento prévio para evitar radiação em tecidos saudáveis. Consiste em sessões diárias de segunda a sexta-feira de duração de alguns minutos, sendo cerca de 35 sessões.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros

Durante o tratamento o paciente será visto semanalmente no ambulatório da oncologia para avaliação clínica. No primeiro dia do uso de ácido valproico será feita coleta de sangue por punção de veia periférica e coleta de saliva para avaliação de moléculas (microRNA e acetilação de histonas) que podem indicar atividade do ácido valproico. As dosagens da acetilação de histonas serão repetidas na segunda semana de uso de ácido valproico e ao término do tratamento. As dosagens de microRNAs serão repetidas também na segunda semana de uso do ácido valproico e após 6 a 8 semanas do término da quimiorradioterapia.

Como é de rotina, antes da aplicação de cada quimioterapia também será realizada coleta de sangue para avaliar anemia, função dos glóbulos brancos e plaquetas, além de exames para avaliar a função renal.

Em cada consulta serão avaliados parâmetros de segurança do tratamento e caso necessário o tratamento será suspenso ou interrompido.

Um questionário para avaliar a qualidade de vida será feito no início da tomada de ácido valproico, ao início da quimiorradioterapia, antes de cada aplicação de cada quimioterapia e ao final do tratamento.

Após seis a oito semanas do término da quimiorradioterapia será feita nova tomografia de face e pescoço para avaliação da resposta ao tratamento.

Você será acompanhado depois de ter terminado o tratamento com consultas mensais e após seis meses com consultas a cada três meses.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

Os riscos esperados da administração do ácido valproico incluem:

Frequentes (>10%): Reações gastrointestinais como náuseas, vômitos, diarreia; sintomas neurológicos como sonolência, tremor e vertigem sem grandes repercussões.

Raríssimos (<0,1%): Pancreatite e arritmias

Os riscos associados a cisplatina incluem:

Frequentes (> 10%): Náuseas e vômitos, alteração leve da audição, anemia leve e se necessário será feita transfusão de glóbulos vermelhos, alterações de função renal, alterações de sensibilidade com sensação passageira de formigamento em membros.

Raras (<1%): Reações alérgicas.

Os riscos associados a radioterapia incluem:

Frequentes (>10%): Radiodermite (lesões na pele), mucosite (aftas na boca), boca seca, alteração da audição/zumbido, Monilíase (sapinho) na boca. Medidas de prevenção serão feitas para evitar ou minimizar esses efeitos colaterais.

Incomum (1-10%): Dificuldade para engolir, fibrose da pele

Com a pré-medicação (frequentes): dores de cabeça, constipação, insônia

Com a coleta de sangue: dor passageira no local da punção

Com a tomografia (raro): reação alérgica ao meio de contraste e, portanto, um médico estará presente durante a realização do exame.

5 – Benefícios para o participante

A hipótese do estudo é a combinação do ácido valproico ao tratamento padrão de quimiorradioterapia aumente a taxa de resposta, ou seja, uma maior diminuição do tumor ou seu desaparecimento. Somente no final do estudo poderemos concluir se isso

realmente aconteceu. Neste caso, é possível que estudos maiores precisem ser feitos para que este tratamento seja rotina na prática clínica. Outros pacientes poderão se beneficiar no futuro das informações trazidas desse estudo.

6 – Tratamentos alternativos, pelos quais você pode optar

A opção de tratamento fora do contexto do estudo é a quimiorradioterapia na mesma forma como escrito acima. 7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Milena Perez Mak que pode ser encontrado no endereço Av Dr. Arnaldo, 251, quinto andar Telefones (11) 3893-2619 e (11) 8183-7952 (24 horas). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (CEP-FMUSP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 1º andar – tel.: 30618004– E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br**

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Você tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – O pesquisador se compromete em utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ” **AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DE ÁCIDO VALPRÓICO COMBINADO AO TRATAMENTO PADRÃO DE QUIMIORRADIOTERAPIA CONCOMITANTE BASEADA EM CISPLATINA, EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO LOCALMENTE AVANÇADO**”

Eu discuti com o Dr. sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pela obtenção
do TCLE Data ____/____/____

Anexo V: Termo de consentimento livre e esclarecido: Voluntários Sadios**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

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 (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .. **AValiação de eficácia de ácido valpróico combinado ao tratamento padrão de quimiorradioterapia concomitante baseada em cisplatina, em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localmente avançado**

PESQUISADOR : Milena Perez Mak.....

CARGO/FUNÇÃO: Médica Oncologia Clínica..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .125006.....

UNIDADE: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Octavio Frias de Oliveira" - ICESP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses.....

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

Este termo contém as informações referentes ao estudo para você decidir sua participação voluntária ou não deste estudo. Caso você aceite participar deste estudo, estará livre para se retirar em qualquer momento.

Pelo presente termo de consentimento você está se voluntariando a participar como população controle de amostra de biomarcadores no presente estudo, através de uma coleta de sangue para dosagem de microRNAs.

O estudo trata da avaliação da eficácia do ácido valproico em combinação ao tratamento padrão para pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço localmente avançado primário de Orofaringe ou Cavidade Oral. O objetivo primário é a avaliação da taxa de resposta. Outras questões a serem avaliadas são a toxicidade a esse tratamento combinado, bem como a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global.

Além disso, para determinar marcadores prognósticos, será feita uma análise exploratória com coleta de microRNAs em sangue e saliva dos pacientes arrolados no estudo. Como não há um padrão do valor de normalidade do nível plasmático de microRNAs, faz-se necessária tal avaliação em uma população sadia.

Este protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital, que é regulado pela legislação nacional para garantir a proteção dos voluntários.

2 – Procedimentos que serão realizados

Após leitura e consentimento para participação do estudo, você se declarará como pessoa sadia, ou seja, não apresenta nenhuma doença crônica em atividade.

Posteriormente será submetido(a) a coleta de sangue para análise do nível plasmático de microRNAs e coleta de saliva para análise de microRNAs.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros

Os procedimentos aos quais você será submetido(a) serão a coleta de sangue e a coleta de saliva especificada no item 2.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

O risco esperado com a coleta de sangue é dor passageira no local da punção. Não há risco com a coleta de saliva.

5 – Benefícios para o participante

Não há benefício para o(a) participante, uma vez que se trata apenas de voluntariado a procedimento de coleta de sangue e saliva.

6 – Tratamentos alternativos, pelos quais você pode optar

Não se aplica.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Milena Perez Mak que pode ser encontrado no endereço Av Dr. Arnaldo, 251, quinto andar Telefones (11) 3893-2619 e (11) 8183-7952 (24 horas). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (CEP-FMUSP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 1º andar – tel: 30618004– E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br**

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros voluntários, não sendo divulgado a identificação de nenhum voluntário;

10 – Você tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – O pesquisador se compromete em utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DE ÁCIDO VALPRÓICO COMBINADO AO TRATAMENTO PADRÃO DE QUIMIOTERAPIA CONCOMITANTE BASEADA EM CISPLATINA, EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO LOCALMENTE AVANÇADO"**

Eu discuti com o Dr. sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

9. REFERÊNCIAS

1. Ferlay F, Bray F, P P, DM P. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base No 5 Version 20. Lyon: IARC Press; 2004.
2. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012;13:607-15.
3. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363:24-35.
4. Boletim do Registro Hospitalar de Câncer. FOSP, 2002. (Accessed 27/05, 2011, at www.fosp.saude.sp.gov.br/docs/boletins/rhc11.pdf.)
5. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 2009;92:4-14.
6. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1695-704.
7. Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, et al. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2011;12:153-9.
8. Haddad R, O'Neill A, Rabinowits G, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy (sequential chemoradiotherapy) versus concurrent chemoradiotherapy alone in locally advanced head and neck cancer (PARADIGM): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:257-64.
9. Cohen EE, Karrison TG, Kocherginsky M, et al. Phase III randomized trial of induction chemotherapy in patients with N2 or N3 locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:2735-43.
10. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1116-27.
11. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354:567-78.

12. Baujat B, Bourhis J, Blanchard P, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy for head and neck cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;CD002026.
13. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:769-84.
14. Camphausen K, Tofilon PJ. Inhibition of histone deacetylation: a strategy for tumor radiosensitization. *J Clin Oncol* 2007;25:4051-6.
15. Zhang Y, Jung M, Dritschilo A. Enhancement of radiation sensitivity of human squamous carcinoma cells by histone deacetylase inhibitors. *Radiat Res* 2004;161:667-74.
16. Karagiannis TC, Kn H, El-Osta A. The epigenetic modifier, valproic acid, enhances radiation sensitivity. *Epigenetics* 2006;1:131-7.
17. Lin CT, Lai HC, Lee HY, et al. Valproic acid resensitizes cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Sci* 2008;99:1218-26.
18. Duenas-Gonzalez A, Garcia-Lopez P, Herrera LA, Medina-Franco JL, Gonzalez-Fierro A, Candelaria M. The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. *Mol Cancer* 2008;7:82.
19. Chinnaiyan P, Cerna D, Burgan WE, et al. Postradiation sensitization of the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Clin Cancer Res* 2008;14:5410-5.
20. Gan CP, Hamid S, Hor SY, et al. Valproic acid: Growth inhibition of head and neck cancer by induction of terminal differentiation and senescence. *Head Neck* 2011.
21. San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1195-206.
22. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products [Internet]. [Accessdata.fda.gov](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm). 2019 [cited 8 July 2019]. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>
23. Ree AH, Dueland S, Folkvord S, et al. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, combined with pelvic palliative radiotherapy for gastrointestinal carcinoma: the Pelvic Radiation and Vorinostat (PRAVO) phase 1 study. *Lancet Oncol* 2010;11:459-64.

24. Chung YL, Wang AJ, Yao LF. Antitumor histone deacetylase inhibitors suppress cutaneous radiation syndrome: Implications for increasing therapeutic gain in cancer radiotherapy. *Mol Cancer Ther* 2004;3:317-25.
25. Valproic Acid With Temozolomide and Radiation Therapy to Treat Brain Tumors. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2006. (Accessed 27-05, 2011, at <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00302159>.)
26. Valproic Acid and Radiation Followed by Maintenance Valproic Acid and Bevacizumab in Children With High Grade Gliomas. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 2009. (Accessed 27-05, 2001, at <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00879437>.)
27. Krauze AV, Myrehaug SD, Chang MG, et al. A Phase 2 Study of Concurrent Radiation Therapy, Temozolomide, and the Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid for Patients With Glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015;92:986-92.
28. NDA 22-152/Stavzor (valproic acid) Delayed Release Tablets. 2008. (Accessed 27-05, 2011, at http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/022152lbl.pdf.)
29. Chavez-Blanco A, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, et al. Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study. *Mol Cancer* 2005;4:22.
30. Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2008;34:206-22.
31. Bug G, Ritter M, Wassmann B, et al. Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia. *Cancer* 2005;104:2717-25.
32. Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, et al. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2006;106:112-9.
33. Atmaca A, Al-Batran SE, Maurer A, et al. Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial. *Br J Cancer* 2007;97:177-82.
34. Blum W, Klisovic RB, Hackanson B, et al. Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2007;25:3884-91.

35. Munster P, Marchion D, Bicaku E, et al. Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *J Clin Oncol* 2007;25:1979-85.
36. Braithe F, Soriano AO, Garcia-Manero G, et al. Phase I study of epigenetic modulation with 5-azacytidine and valproic acid in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res* 2008;14:6296-301.
37. Karpenko MJ, Liu Z, Aimuwu J, et al. Phase I study of 5-aza-2'-deoxycytidine in combination with valproic acid in patients with NSCLC. *ASCO Meeting Abstracts* 2008;26:3502.
38. Su JM, Li XN, Thompson P, et al. Phase 1 study of valproic acid in pediatric patients with refractory solid or CNS tumors: a children's oncology group report. *Clin Cancer Res* 2011;17:589-97.
39. Wheler JJ, Janku F, Falchook GS, et al. Phase I study of anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab and histone deacetylase inhibitor valproic acid in patients with advanced cancers. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;73:495-501.
40. Falchook GS, Fu S, Naing A, et al. Methylation and histone deacetylase inhibition in combination with platinum treatment in patients with advanced malignancies. *Invest New Drugs* 2013;31:1192-200.
41. Bilen MA, Fu S, Falchook GS, et al. Phase I trial of valproic acid and lenalidomide in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:869-74.
42. Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, et al. Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood* 2006;108:3271-9.
43. Soriano AO, Yang H, Faderl S, et al. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2007;110:2302-8.
44. Daud AI, Dawson J, DeConti RC, et al. Potentiation of a topoisomerase I inhibitor, karenitecin, by the histone deacetylase inhibitor valproic acid in melanoma: translational and phase I/II clinical trial. *Clin Cancer Res* 2009;15:2479-87.

45. Rocca A, Minucci S, Tosti G, et al. A phase I-II study of the histone deacetylase inhibitor valproic acid plus chemoimmunotherapy in patients with advanced melanoma. *Br J Cancer* 2009;100:28-36.
46. Munster P, Marchion D, Bicaku E, et al. Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC. *Clin Cancer Res* 2009;15:2488-96.
47. Iwahashi S, Utsunomiya T, Imura S, et al. Effects of Valproic Acid in Combination with S-1 on Advanced Pancreatobiliary Tract Cancers: Clinical Study Phases I/II. *Anticancer Res* 2014;34:5187-91.
48. Kuendgen A, Knipp S, Fox F, et al. Results of a phase 2 study of valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid in 75 patients with myelodysplastic syndrome and relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2005;84 Suppl 1:61-6.
49. Pilatrin C, Cilloni D, Messa E, et al. Increase in platelet count in older, poor-risk patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome treated with valproic acid and all-trans retinoic acid. *Cancer* 2005;104:101-9.
50. Candelaria M, Gallardo-Rincon D, Arce C, et al. A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Ann Oncol* 2007;18:1529-38.
51. Raffoux E, Cras A, Recher C, et al. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Oncotarget* 2010;1:34-42.
52. Mohammed TA, Holen KD, Jaskula-Sztul R, et al. A pilot phase II study of valproic acid for treatment of low-grade neuroendocrine carcinoma. *Oncologist* 2011;16:835-43.
53. Issa JP, Garcia-Manero G, Huang X, et al. Results of phase 2 randomized study of low-dose decitabine with or without valproic acid in patients with myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2015;121:556-61.
54. Coronel J, Cetina L, Pacheco I, et al. A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results. *Med Oncol* 2010.

55. Tassara M, Dohner K, Brossart P, et al. Valproic acid in combination with all-trans retinoic acid and intensive therapy for acute myeloid leukemia in older patients. *Blood* 2014;123:4027-36.
56. Haigentz M, Jr., Kim M, Sarta C, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin in patients with recurrent/metastatic head and neck cancer. *Oral Oncol* 2012;48:1281-8.
57. Gray JE, Haura E, Chiappori A, et al. A phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of panobinostat, an HDAC inhibitor, combined with erlotinib in patients with advanced aerodigestive tract tumors. *Clin Cancer Res* 2014;20:1644-55.
58. Kang H, Gillespie TW, Goodman M, et al. Long-term use of valproic acid in US veterans is associated with a reduced risk of smoking-related cases of head and neck cancer. *Cancer* 2014;120:1394-400.
59. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res* 2009;88:300-6.
60. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* 2010;2:15.
61. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009;27:1992-8.
62. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10:550-60.
63. Luczak MW, Jagodzinski PP. Apicidin down-regulates human papillomavirus type 16 E6 and E7 transcripts and proteins in SiHa cervical cancer cells. *Cancer Lett* 2008;272:53-60.
64. Finzer P, Krueger A, Stohr M, et al. HDAC inhibitors trigger apoptosis in HPV-positive cells by inducing the E2F-p73 pathway. *Oncogene* 2004;23:4807-17.
65. de la Cruz-Hernandez E, Perez-Cardenas E, Contreras-Paredes A, et al. The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors on human papillomavirus early gene expression in cervical cancer, an in vitro and clinical study. *Viol J* 2007;4:18.

66. Sami S, Hoti N, Xu HM, Shen Z, Huang X. Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both in vitro and in vivo. *J Biochem* 2008;144:357-62.
67. Chavez-Blanco A, Perez-Plasencia C, Perez-Cardenas E, et al. Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 2006;6:2.
68. Chen J, Ghazawi FM, Bakkar W, Li Q. Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. *Mol Cancer* 2006;5:71.
69. Lin Z, Bazzaro M, Wang MC, Chan KC, Peng S, Roden RB. Combination of proteasome and HDAC inhibitors for uterine cervical cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2009;15:570-7.
70. Darvas K, Rosenberger S, Brenner D, et al. Histone deacetylase inhibitor-induced sensitization to TNFalpha/TRAIL-mediated apoptosis in cervical carcinoma cells is dependent on HPV oncogene expression. *Int J Cancer* 2010;127:1384-92.
71. Marsoni S, Damia G, Camboni G. A work in progress: the clinical development of histone deacetylase inhibitors. *Epigenetics* 2008;3:164-71.
72. Cho JH, Dimri M, Dimri GP. MicroRNA-31 is a transcriptional target of histone deacetylase inhibitors and a regulator of cellular senescence. *J Biol Chem* 2015;290:10555-67.
73. Hsieh TH, Hsu CY, Tsai CF, et al. HDAC inhibitors target HDAC5, upregulate microRNA-125a-5p, and induce apoptosis in breast cancer cells. *Mol Ther* 2015;23:656-66.
74. Langevin SM, Stone RA, Bunker CH, et al. MicroRNA-137 promoter methylation is associated with poorer overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2011;117:1454-62.
75. Fu X, Han Y, Wu Y, et al. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and Meta-analysis. *Eur J Clin Invest* 2011.
76. Li J, Huang H, Sun L, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res* 2009;15:3998-4008.

77. Jamali Z, Asl Aminabadi N, Attaran R, Pournagiazar F, Ghertasi Oskoue S, Ahmadpour F. MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2015;51:321-31.
78. Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res* 2008;14:2588-92.
79. de Jong MC, Ten Hoeve JJ, Grenman R, et al. Pretreatment microRNA Expression Impacting on Epithelial-to-Mesenchymal Transition Predicts Intrinsic Radiosensitivity in Head and Neck Cancer Cell Lines and Patients. *Clin Cancer Res* 2015;21:5630-8.
80. Liu CJ, Kao SY, Tu HF, Tsai MM, Chang KW, Lin SC. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis* 2010;16:360-4.
81. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 2011;278:1598-609.
82. Zen K, Zhang CY. Circulating MicroRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev* 2010.
83. Salazar C, Nagadia R, Pandit P, et al. A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell Oncol (Dordr)* 2014;37:331-8.
84. Khan O, Fotheringham S, Wood V, et al. HR23B is a biomarker for tumor sensitivity to HDAC inhibitor-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:6532-7.
85. Weichert W, Roske A, Niesporek S, et al. Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2008;14:1669-77.
86. Chang CC, Lin BR, Chen ST, Hsieh TH, Li YJ, Kuo MY. HDAC2 promotes cell migration/invasion abilities through HIF-1alpha stabilization in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011.
87. Chang HH, Chiang CP, Hung HC, Lin CY, Deng YT, Kuo MY. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. *Oral Oncol* 2009;45:610-4.
88. Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, et al. A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat Genet* 2006;38:566-9.

89. Aggarwal R, Thomas S, Pawlowska N, et al. Inhibiting Histone Deacetylase as a Means to Reverse Resistance to Angiogenesis Inhibitors: Phase I Study of Abexinostat Plus Pazopanib in Advanced Solid Tumor Malignancies. *J Clin Oncol* 2017;35:1231-9.
90. de Castro G, Jr., Snitcovsky IM, Gebrim EM, et al. High-dose cisplatin concurrent to conventionally delivered radiotherapy is associated with unacceptable toxicity in unresectable, non-metastatic stage IV head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:1475-82.
91. Oliveira IdCdEdSPOFd. Manual de Condutas em Oncologia. São Paulo-SP: Impresa Oficial do Estado de São Paulo; 2010.
92. Gouvea de Lima A, Villar RC, de Castro G, Jr., et al. Oral mucositis prevention by low-level laser therapy in head-and-neck cancer patients undergoing concurrent chemoradiotherapy: a phase III randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;82:270-5.
93. Simon R. Optimal two-stage designs for phase II clinical trials. *Control Clin Trials* 1989;10:1-10.
94. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228-47.
95. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101-8.
96. Zhang M, Li H, Ma H, Qin J. A simple microfluidic strategy for cell migration assay in an in vitro wound-healing model. *Wound Repair Regen* 2013;21:897-903.
97. Selt F, Deiß A, Korshunov A, et al. Pediatric Targeted Therapy: Clinical Feasibility of Personalized Diagnostics in Children with Relapsed and Progressive Tumors. *Brain Pathol* 2016;26:506-16.
98. Gheit T, Billoud G, de Koning MN, et al. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method combined with DNA microarray primer extension to detect Betapapillomavirus types. *J Clin Microbiol* 2007;45:2537-44.
99. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006;44:504-12.

100. Osoba D, Rodrigues G, Myles J, Zee B, Pater J. Interpreting the significance of changes in health-related quality-of-life scores. *J Clin Oncol* 1998;16:139-44.
101. Creighton CJ, Fountain MD, Yu Z, et al. Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. *Cancer Res* 2010;70:1906-15.
102. Zhang Y, Guo J, Li D, et al. Down-regulation of miR-31 expression in gastric cancer tissues and its clinical significance. *Med Oncol* 2010;27:685-9.
103. Chang TC, Yu D, Lee YS, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 2008;40:43-50.
104. Zhou Z, Zhou L, Jiang F, et al. Downregulation of miR-222 Induces Apoptosis and Cellular Migration in Adenoid Cystic Carcinoma Cells. *Oncol Res* 2017;25:207-14.
105. Sachdeva M, Zhu S, Wu F, et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:3207-12.
106. Teknos TN, Grecula J, Agrawal A, et al. A phase 1 trial of Vorinostat in combination with concurrent chemoradiation therapy in the treatment of advanced staged head and neck squamous cell carcinoma. *Invest New Drugs* 2018.
107. Zhao H, Yu Z, Zhao L, et al. HDAC2 overexpression is a poor prognostic factor of breast cancer patients with increased multidrug resistance-associated protein expression who received anthracyclines therapy. *Jpn J Clin Oncol* 2016;46:893-902.
108. Yeo W, Chung HC, Chan SL, et al. Epigenetic therapy using belinostat for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a multicenter phase I/II study with biomarker and pharmacokinetic analysis of tumors from patients in the Mayo Phase II Consortium and the Cancer Therapeutics Research Group. *J Clin Oncol* 2012;30:3361-7.
109. Olofsson A, Willen H, Goransson M, et al. Abnormal expression of cell cycle regulators in FUS-CHOP carrying liposarcomas. *Int J Oncol* 2004;25:1349-55.
110. Kabjorn Gustafsson C, Stahlberg A, Engstrom K, Danielsson A, Turesson I, Aman P. Cell senescence in myxoid/round cell liposarcoma. *Sarcoma* 2014;2014:208786.

111. Suraweera A, O'Byrne KJ, Richard DJ. Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Front Oncol* 2018;8:92.