

FANNY DANTAS DE LIMA

**Fase 1 do estudo da aplicação da vacina de
DNA HSP 65 (*Heat Shock Protein*) do
Mycobacterium leprae no tratamento de formas
avançadas de carcinoma epidermóide de
cabeça e pescoço**

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientador: Dr. Kald Ali Abdallah

São Paulo

2007

Aos meus pais Jordão e Maria José pelo seu
amor incondicional razão de tudo que sou.

Aos pacientes desta tese e seus familiares pelo seu exemplo de esperança e amor a vida que para sempre vão viver em minha memória e meu coração.

Agradecimentos

Ao meu orientador e grande amigo Kald Ali Abdallah por me permitir e incentivar a realizar este trabalho, abrindo as portas para que eu chegasse até aqui.

Ao amigo e Mestre Dr. Pedro Michaluart por sempre trazer equilíbrio ao grupo e me auxiliar no cuidado de pacientes tão graves.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pelas orientações, críticas e sugestões ao trabalho e principalmente pelo apoio, estímulo e disponibilidade constantes.

Prof. Dr. Célio Lopes Silva pelo seu exemplo de dedicação a ciência que tanto me influenciou.

Prof. Dr. Alberto Ferraz que incentivou e facilitou nossa parceria com a Divisão de Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Ao Dr. Oswaldo Moreira Leal que desde a Residência médica primou pelo ensino da imunologia clínica, aprendizado fundamental para que eu aqui chegasse.

Aos meus amigos Rodney e Raquel que no dia-a-dia de trabalho me ensinaram que um sonho conjunto se transforma em realidade.

Às Preceptoras da Imunologia Fabiane e Ana Karolina cujo auxílio foi fundamental para conduzir o protocolo.

Às Residentes Ana Lucia e Maria Helena pela sua colaboração no cuidado dos pacientes.

Ao meu amigo Serafim com sua disponibilidade e eficiência características, que muito me ajudou em inúmeros problemas.

À secretária da Disciplina de Alergia e Imunopatologia, Tânia Joyce, pelo auxílio e atenção, temperados com muito amor e carinho, desde o início da Residência Médica.

À secretária da Comissão de Pós-graduação Eliana pela disponibilidade e colaboração freqüentes.

Aos amigos e funcionários do Ambulatório de Imunologia e Alergia Genair, Hilário, Rosana e Leoni pela ajuda no cuidado dos pacientes.

Às amigas Teresa Sodre, Kariane Fernandes e Lika Arakawa que muito trabalharam e contribuíram para a realização deste trabalho.

A minha primeira professora, minha irmã Fabiana, que me ensinou a dar os primeiros passos nesta vida.

Ao meu Mestre e grande amigo Dr. João Carlos Domingues Repka, meu Professor de Imunologia Básica, que ainda na faculdade me contaminou com seu fascínio pela Imunologia e pesquisa científica.

A minha querida amiga Silvinha pelo apoio no trabalho e sua amizade e carinho permanentes.

Aos meus queridos amigos Venceslau, Renato, Juliana, Karyne, João Henrique, Rita, Camila, e Marcelo por compartilhar minhas alegrias e tristezas e sobretudo me apoiar durante todo este tempo.

À toda minha abençoada família pelo amor e carinho que nos une e me tornam cada dia mais forte e feliz.

A vida é breve, a arte é longa, a ocasião fugidia, a experiência enganosa, o julgamento difícil...

Hipocrates

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo do estudo.....	7
2 REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	9
2.2 Imunologia do câncer	11
2.3 O <i>Mycobacterium sp</i> como adjuvante de uma resposta imune.....	14
2.4 Utilização da vacina de DNA da HSP65 do <i>M.leprae</i> em câncer...15	
2.5 Considerações sobre segurança no uso de uma vacina de DNA..19	
2.6 Como realizar um estudo clínico fase 1.....	23
3 PACIENTES E MÉTODOS	30
3.1 Desenho experimental.....	31
3.2 Critérios de Elegibilidade.....	32
3.3 Vacina de DNA HSP65 do <i>Mycobacterium leprae</i>	34
3.4 Protocolo do estudo.....	41
3.4.1 Cronograma da aplicação da vacina.....	41
3.4.2 Aplicação do CTCAE.....	44
4 RESULTADOS	47
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÕES	71
7 ANEXOS	73
8 REFERÊNCIAS	99

LISTAS DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: síndrome da imunodeficiência humana adquirida
BCG: Bacilo calmete guerain
BCT: Banco de Células de Trabalho
CD4+: cluster of differentiation 4
CD8+: cluster of differentiation 8
CEC: carcinoma epidermóide
CPK: enzima creatino-fosfo-quinase
CH100: complemento total
CMV: citomegalovírus
DEPC: dietil pirocarbonato
DHL: desidrogenase lática
DNase: enzima que degrada DNA
cDNA: DNA complementar
DNA: ácido desoxiribonucléico
EA: evento adverso
EBV: epstein barr vírus
EDTA : anticoagulante
et al: e outros
FTAbs: exame para detector anticorpos contra *T.pallidum*
GM-CSF granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HLA : *human leucocyte antigen*
HCV: vírus da hepatite C
HBV: vírus da hepatite B
HSP65: heat shock protein ou proteína de choque térmico
HSV: vírus Herpes simplex
HPV: papiloma vírus humano
hTLR9: *toll like receptor 9*
HSP65: heat shock protein 65
IFN γ : interferon gama
IgE: imunoglobulina E
IgA: imunoglobulina A
IgM: imunoglobulina M
IgG: imunoglobulina G
IL-2: interleucina 2
IL-4: interleucina 4
IL-10: interleucina 10
IL-12: interleucina 12
LB: linfócito B
LIT: linfócitos infiltrantes de tumor
LT: linfócito T
J774: linhagem celular de sarcoma murino

M.leprae: *Mycobacterium leprae*
Mycobacterium sp gênero das micobactérias
MHC: major histocompatibility complex
mRNA: RNA mensageiro
NK: linfócitos *natural killer*
PBS: meio de cultura
PCR reação em cadeia polimerase
PPD: teste da tuberculina
QT: quimioterapia
RT: radioterapia
RNase: enzima que degrada RNA
RTPCR:Retro-Transcrição
RNA: ácido ribonucléico
TADA:trato aéreo digestivo alto
TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido
TCT: teste cutâneo de hipersensibilidade tardia
TGF β : *transforming growth factor*
Th1: T helper tipo 1
Th2:T helper tipo 2
TGO: transaminase glutâmico oxalacética
TGP: transaminase pirúvica
TG: tireoglobulina
T3: hormônio triiodotironina
T4: hormônio tetraiodotironina
TPO: tireo-peroxidase
TSH: hormônio tireoestimulante
TNM: classificação de tumores (tumor, nodes, metastasis)
TNF α : *necrosis tumor factor alfa*
USG: ultrasonografia
VDRL: *venereal treponemic disease*
VHS: velocidade de hemossedimentação

LISTA DE SÍMBOLOS

PH potencial de hidrogenio

V - volt

Mm - milimolar

mm³ milimetro cúbico

mg -miligrama

μL - microlitro

MHz - megahertz

Min - minutos

UV ultravioleta

Kv –kilivolt

UI – unidade internacional

μg - micrograma

°C – grau celsius

Cm centimetro

LISTA DE SIGLAS

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CTCAE: Common Terminology Criteria of Adverse Events

ICH: *International Conference on Harmonization*

NCI: National Cancer Institute

FDA: Food and Drug Administration

CAPPesq: Comissão Interna de Pesquisa do HCFMUSP

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CIBio: Comissão Interna de Biossegurança

CTNBio: Comissão Nacional de Biossegurança

WHO: *World Health Organization*

RECIST: *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*

HCFMUSP: Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronograma de aplicação da vacina	31
Figura 2 – Foto de paciente estudado	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – grupo A e distribuição por: gênero, idade, localização do tumor, classificação TNM, estágio, volume tumoral, índice de massa corporal (IMC) e índice de Karnofsky pré-tratamento e tratamento prévio ao protocolo.....	50
Tabela 2 – grupo A e caracterização quanto à ocorrência de EA com respectiva graduação e causalidade; testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (TCT) pré e pós-inclusão; intervalo entre a 1ª dose e o óbito e, causa mortis.....	51
Tabela 3 – grupo B e distribuição por gênero, idade, localização do tumor, classificação TNM, estágio, volume tumoral, índice de massa corporal (IMC) e índice de Karnofsky pré tratamento.....	54
Tabela 4 – grupo B e caracterização quanto à ocorrência de EA com sua respectiva graduação e causalidade; testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (TCT) pré e pós inclusão; intervalo entre a 1ª dose e óbito e causa mortis.....	55
Tabela 5 – grupo C e distribuição por gênero, idade, localização do tumor, classificação TNM, estágio, volume tumoral; índice de massa corporal (IMC) e índice de Karnofsky.....	57
Tabela 6 – grupo C e caracterização quanto à ocorrência de eventos adversos com sua respectiva graduação e causalidade ; testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (TCT) pré e pós inclusão; intervalo entre a 1ª dose e óbito e causa mortis.....	58
Tabela 7 – taxa de sobrevida dos pacientes.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – curva de sobrevida dos pacientes.....61

RESUMO

LIMA, F.D. **Fase 1 do estudo da aplicação da vacina de DNA HSP 65 (Heat Shock Protein) do *Mycobacterium leprae* no tratamento de formas avançadas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.** São Paulo, 2007. 122p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

O objetivo deste estudo foi descrever e mapear a toxicidade local e sistêmica da aplicação da vacina de DNA HSP 65 do *Mycobacterium leprae* em pacientes com formas avançadas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e definir qual a dose máxima tolerada. Trata-se de um estudo prospectivo, randomizado, aberto, sem grupo controle, de fase 1, com utilização de uma nova vacina para o tratamento de dezoito pacientes com carcinoma epidermóide avançado de cabeça e pescoço, sem opção terapêutica curativa, índice de Karnofsky maior que 70%, sem outra doença sistêmica grave. Propôs-se 3 grupos de 6 indivíduos, cada grupo recebendo diferente dose da vacina, respectivamente 150µg; 600µg e 1200µg por dose. A administração desta foi feita em 3 injeções com intervalo de 21 dias. Durante 90 dias os pacientes eram rigorosamente avaliados clínico e laboratorialmente quanto à ocorrência de eventos adversos (EA). A pesquisa de EA foi baseada no *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)* elaborado pelo *National Cancer Institute (NCI)*. No primeiro grupo (150 µg) um paciente morreu por sangramento abundante de úlcera tumoral antes do fim do protocolo. Todos os pacientes referiram aumento da dor; três tiveram maior edema e dois piora da astenia; três tiveram infecções de pele e/ou tecido subcutâneo da cabeça e pescoço e um infecção do trato respiratório superior. No 2º grupo (600 µg) três pacientes faleceram antes dos 90 dias de protocolo por causas não relacionadas ao tratamento, descritas a seguir: complicações de gastrostomia, rápida progressão tumoral e hemorragia fatal e carcinomatose pulmonar. Neste grupo um paciente não teve EA; cinco tiveram piora da dor; quatro aumento do edema; dois maior astenia; três celulite de face e dois apresentaram sinusite aguda. Como neste grupo observou-se toxicidade classificada como relacionada ao tratamento graus 3 e 4 em mais de um terço dos pacientes decidiu-se escalonar para baixo a dose no 3º grupo para 400 µg. No último grupo três pacientes morreram por progressão tumoral rápida, sem completar o protocolo, então incluiu-se três novos indivíduos. Todos tiveram maior dor; três aumento do edema; três piora da astenia; um caso de erisipela; três com infecção pulmonar e um com sinusite aguda; um paciente apresentou linfonodomegalia peri-tumoral após receber a vacina. Concluiu-se que a administração desta vacina neste grupo de pacientes é segura na dose de 400 µg e tem como principal toxicidade aumento dos sinais inflamatórios na lesão tumoral e maior ocorrência de infecções locais e respiratórias.

Descritores: 1.Vacinas anti-câncer/efeitos adversos 2.Vacinas anticâncer/toxicidade 3.Vacinas anti-câncer/administração & dosagem 4.Carcinoma de células escamosas 5.Neoplasias de cabeça e pescoço

SUMMARY

LIMA, F.D. **Gene therapy of advanced-stage head and neck squamous cell carcinoma with *Mycobacterium leprae* heat shock protein 65 DNA: A phase 1 study.** São Paulo, 2007. 122p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

This study goal was to describe and graduate the local and systemic toxicity of intratumoral injections of HSP(Heat Shock Protein) 65 DNA vaccine in advanced-stage head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN) patients and to define the highest well tolerated dose for them. This is a prospective, non-randomized, uncontrolled, phase 1 study, using a new vaccine to treat eighteen patients with advanced-stage SCCHN patients without any option for curative treatment, Karnofsky performance status greater than 70% and no organ failure. The patients were divided into 3 groups of 6 patients each one, receiving different vaccine doses, 150µg; 600µg e 1200µg per dose, respectively. They received three injections with a 21 days interval. The patients were rigorously evaluated into their clinical and laboratory aspects looking for adverse events (AE) during 90 days. Toxic effects were monitored according to National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). In the first group (150µg) one patient died due to an ulcerate lesion extensive bleeding before the protocol end. All the patients referred pain increase; tree had greater edema; two had strong fatigue; tree presented with cutaneous infections of head and neck and one with an acute sinusitis. In the second group (600µg) three patients died before the 90th day protocol, all considered unrelated to treatment, following described: gastrostomy complications, a fatal bleeding after rapid progression of the tumor and pulmonary carcinomatosis. In this group one patient didn't have adverse events; five had pain worsening; four had increase of edema; two had greater fatigue; tree had facial cellulitis and two had acute sinusitis. Due to grade 3 and 4 adverse events occurred in more than one third of patients of this group we decided to lower the dose of the third group to 400µg. In the last group three patients also died before protocol completion, all due to cancer progression, so we had to include three more patients in this group. All of them presented greater pain; tree had increasing of edema; tree had fatigue worsening; tree had pulmonary infections; one had acute sinusitis and lymphadenomegalia besides the tumor lesion. We concluded that intratumoral injections of *M.leprae* HSP 65 DNA in advanced-stage SCCHN patients is safe at the dose of 400µg/injection and cause tumor flare adverse events and an increase rate of local and respiratory infections.

Descriptors:

1-Cancer vaccines/adverse effects 2-Cancer vaccines/administration & dosage 3-Cancer vaccines/toxicity 4-Carcinoma squamous cell 5-Head and neck neoplasms

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

Denomina-se como câncer de cabeça e pescoço aqueles que acometem o trato aéreo-digestivo alto que inclui as seguintes regiões anatômicas: cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e laringe. Nestas regiões o tipo histológico mais prevalente, responsável por 95% dos casos, é o carcinoma epidermóide (CEC).

Apesar do constante avanço do conhecimento médico sobre a biologia do câncer e conseqüentemente de intervenções terapêuticas mais eficazes, o manejo de pacientes principalmente sob estádios de doença mais avançados, constitui-se num dos maiores desafios dentro da prática médica. No Brasil 2,84% dos óbitos causados por câncer tiveram sua origem na cavidade oral e 2,09% na laringe (INCA, 2000). O Ministério da Saúde propõe que em 2006 o tumor de boca acometeu 10.060 homens e 3.410 mulheres (INCA, 2006).

A associação entre o tabagismo e a ingestão de álcool ao desenvolvimento de CEC do trato aéreo-digestivo alto tem se mostrado muito clara, pois mesmo com um tumor já diagnosticado, a persistência destes vícios diminui o índice de cura do doente e aumenta a probabilidade de ocorrência de um segundo tumor primário (Revista Brasileira de Cancerologia, 2001).

No câncer de boca outros fatores de risco importantes são: má higiene oral e uso de próteses dentárias mal-ajustadas (INCA,2006). No Brasil a coexistência destes fatores num mesmo indivíduo é muito freqüente e desta forma compreendemos porque tais tumores são tão prevalentes em nossa população (INCA, 2006).

O tumor de cabeça e pescoço é agressivo e a possibilidade de cura depende sobremaneira da fase em que é feito o diagnóstico. Quando descoberto precocemente, a cura pode ser atingida com ressecção cirúrgica e radioterapia. Nas recidivas e casos avançados são indicadas cirurgia combinada com reconstrução, radioterapia e quimioterapia com taxas de sobrevida em cinco anos, variando entre 20 a 50% (Revista Brasileira de Cancerologia, 2001). São considerados avançados os tumores com estádios III ou IV.

A disseminação do câncer de cabeça e pescoço é principalmente locorregional, comprometendo a qualidade de vida dos indivíduos por gerar dor intensa, distúrbios da deglutição e respiração e mutilação. Pela facilidade de invasão de estruturas nobres da cabeça e do pescoço, tais como, grandes vasos, pares de nervos cranianos e fáscia pré-vertebral, muitos tumores tornam-se precocemente inoperáveis e novas formas de tratamento poderão trazer grande impacto na expectativa e qualidade de vida destes pacientes.

A imunoterapia em câncer é uma antiga forma de tratamento retomado nos últimos anos e como outras formas de tratamento biológico do câncer mostrou resultados importantes. A possibilidade de potencializar a resposta

imune contra o câncer representa uma das grandes esperanças mundiais no combate as neoplasias (Rosemberg, 2000; Bendani, 1999).

A demonstração de que as células “in vivo”, principalmente células em intensa replicação, como as células tumorais captam e expressam o plasmídeo de DNA com muito mais facilidade do que inicialmente previsto, ocasionou um grande interesse pelo uso de vacinas de DNA no tratamento do câncer [Greten, 1999]. Estas vacinas de DNA induzem a expressão de um peptídeo tumoral e conseqüente aumento da resposta imune celular contra este levando à destruição tumoral (Rosemberg, 2000). Também é possível que a utilização intratumoral destes agentes induzam à expressão conjunta de antígenos tumorais e antígenos infecciosos, facilitando uma resposta antitumoral cruzada (Greten, 1999).

A HSP 65 faz parte da família das proteínas de choque térmico, tem 65 kilodaltons de peso molecular, é uma *chaperona*, componente responsável pela manutenção da homeostasia intracelular por facilitar o processamento e transporte de proteínas para a superfície celular, formando complexos MHC de classe I e II, facilitando assim a apresentação de antígenos aos linfócitos T (Pardoll,1999). Por este motivo são potentes imunoestimulantes e são estudadas como adjuvantes em vacinas contra o câncer e infecções (Segal, 2006).

Lukacs et al. demonstraram que a inserção *ex vivo* do gene da HSP65 do *M. Leprae* em linhagens de células tumorais resultou na incapacidade destas células de formar tumores em camundongos imunocompetentes.

Este grupo também descreve que a transfecção do mesmo gene in vivo causou a regressão de modelos experimentais de tumores altamente agressivos. Isto ocorreu em camundongos imunocompetentes e não em camundongos com imunodeficiência combinada grave, sugerindo que a presença de células T mediaram a resposta anti-tumoral e erradicaram o tumor (Lukacs, 1997). Tais dados sugerem que a utilização de HSP65 do *M.leprae* pode ser uma nova abordagem no tratamento de tumores estabelecidos. Lukacs et al. também demonstraram que a utilização de uma linhagem de células tumorais - sarcoma J774 - transfectada com o gene do HSP65 do *M. leprae* (*Cell line J774-HSP65*) também induziu proteção contra o crescimento de tumores da linhagem original que não expressava o gene HSP65, a linhagem tumoral pura. Esta reatividade cruzada demonstra que a resposta imune contra o tumor não se dirige exclusivamente a epitópos da HSP65 e que esta se estende contra outros antígenos, indicando que a HSP65 predispõe a quebra da tolerância imunológica aos antígenos tumorais, fornecendo o racional de uma indução de resposta cruzada na transfecção de um tumor com antígenos do *M.leprae* (Lukacs,1993).

A vacina de DNA-HSP65 do *M.leprae* já demonstrou ser capaz de gerar uma potente resposta imune celular do tipo Th1 em modelos animais (Lowrie, 1999). Pardoll e Hung sugeriram que esta vacina tenha papel na indução de imunidade anti-tumoral também no ser humano. (Pardoll, 1999; Hung, 1998).

Através da cooperação estabelecida entre as Divisões de Imunologia Clínica e Alergia e de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, ambas do Hospital das

Clínicas e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e o Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia e de Vacinas Gênicas da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, propôs-se um Estudo Clínico Fase 1, que teria como finalidade a administração intratumoral da vacina de DNA HSP65 do *Mycobacterium leprae*, em pacientes com carcinoma epidermóide do trato aéreo-digestivo alto refratário ao tratamento padrão e sem outras opções terapêuticas. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa no desenvolvimento de ensaios clínicos aplicando novas abordagens de terapia biológica do câncer sistêmico.

A realização de um ensaio clínico fase 1 exige composição de equipe multidisciplinar, neste caso composta por médicos Imunologistas clínicos e Cirurgiões de cabeça e pescoço, Psicólogo, Fonoaudiólogo e Nutricionista e elaboração de um minucioso protocolo que previa passo-a-passo como o paciente em estudo seria avaliado (Anexo A). Estruturação fundamental para permitir o estudo e acompanhamento de pacientes tão delicados quanto estes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço avançado. Esta população compreende doentes subnutridos ou desnutridos, que recebem alimentação por sondas, muitos traqueostomizados, que sofrem de muita dor, hemorragias e outras complicações decorrentes da progressão do câncer. Apesar de todos os procedimentos serem pré-determinados, um ensaio clínico fase 1 é artesanal, pois há que se gerenciar o fato de suspender uma avaliação prevista em decorrência de uma limitação clínica do doente, sem obrigatoriamente ter que excluí-lo do protocolo.

1.1 Objetivo do estudo

Testar a segurança clínica da utilização da vacina de DNA HSP65 do *Mycobacterium leprae* em pacientes com carcinoma epidermóide avançado do trato aéreo-digestivo alto refratário ao tratamento padrão, observando os eventos adversos decorrentes do seu uso e para se definir a dose máxima tolerável desta para aplicação em futuro ensaio tipo Fase 2.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

O tratamento das afecções de cabeça e pescoço é complexo devido ao grande número de estruturas nobres na região. Nas últimas décadas, os avanços cirúrgicos deveram-se principalmente a melhora da anestesia, dos cuidados peri-operatórios e à reconstrução com retalhos livres. Com a segurança da reconstrução tornou-se possível a ressecção ampla de tumores que antes não eram operados devido a mutilação no pós-operatório. Dessa forma se obteve melhora do controle do tumor primário porém a doença regional - metástase linfonodal - continuou sendo o determinante do fracasso terapêutico.(Cernea, 1997).

Independente da localização do tumor primário na região do trato aéreo-digestivo alto, o local mais freqüente de metástases é o pescoço. Não se conhecem todas as condições necessárias para que o tumor seja propenso a apresentar metástases porém sabemos que o tamanho, a profundidade, o caráter infiltrativo do tumor e a imunodepressão do paciente são fatores implicados no aparecimento das metástases ou maior disseminação locorregional (Abraham, 2001).

Quando já existe doença regional ao diagnóstico de carcinoma epidermóide mucoso de cabeça e pescoço, o tratamento proposto na Divisão de Cirurgia de Cabeça e Pescoço – HCFMUSP é a cirurgia seguida de radioterapia. Apesar desse tratamento agressivo, a recorrência local da doença é freqüente e, via de regra, o determinante do óbito do paciente.

Nos casos de recidiva cervical após cirurgia e radioterapia, muito pouco existe para ser oferecido ao paciente. A principal terapêutica nesses casos é a quimioterapia sistêmica. Esse tratamento além de ser apenas paliativo em muitos casos, não é isento de eventos adversos e também muitas vezes necessita de internação hospitalar prolongada. Já os casos mais avançados, classificados como estágio III e IV requerem tratamento mais complexo, que usualmente consiste na associação de modalidades terapêuticas; cirurgia seguida de radioterapia ou radioterapia combinada com quimioterapia. Não existe consenso quanto a qual deve ser o tratamento inicial ideal dependendo da localização do tumor (Forastiere, 2001). As particularidades de apresentação de cada caso e a experiência da equipe que vai prestar a assistência devem ser levadas em conta. Os defeitos resultantes da doença e do tratamento, por vezes têm grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, causam alterações morfológicas e fisiológicas importantes, e requerem grandes esforços para a readaptação dos pacientes ao convívio social habitual.

O prognóstico dos casos avançados que representam até dois terços dos pacientes no momento do primeiro diagnóstico (Forastiere,2001) é significativamente pior, com índices de recidiva locorregional de cerca de

50% (Conley 2006, Vermorken 2005) e metástases à distância de até 20% dos casos (Vermorken 2005).

Quando ocorre recidiva da doença ela mais freqüentemente é local ou regional, e 50% dos pacientes não são passíveis de tratamento curativo (Kowalsky, 2002). Os índices de resposta são baixos nas recidivas e nas tentativas de palição, variando entre 15 e 30% (Hong, 1983 e Al Sarraf, 1988). Quanto à sobrevida dos portadores de doença avançada, em uma população semelhante à nossa amostra, Carvalho observou em pacientes submetidos a cuidados paliativos 15,9% em 1 ano (Carvalho, 2005).

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

2.2 Imunologia do câncer

Os tumores são geneticamente instáveis e a emergência destas variações genéticas garantem a sobrevida do tumor frente ao sistema imune (Rosemberg, 2000). As células tumorais reconhecidas pelo sistema imune são eliminadas e as que são ignoradas por este sobrevivem caracterizando o processo de sobrevivência e seleção positiva pelo sistema imune. A teoria de sobrevivência ao sistema imune foi introduzida por Burnett e Thomas em 1950 e na sua atual interpretação enfatiza-se a habilidade da imunidade do

hospedeiro em detectar e destruir células tumorais e incorpora a premissa de que os tumores não são alvos passivos, pois são capazes de escapar e desorganizar a resposta imune do hospedeiro. A teoria atual reconhece que é bidirecional a interação entre imunidade e câncer e que esta é influenciada diretamente pelo microambiente local. O conhecimento das formas pelas quais os tumores evadem da resposta imune permite programar novas terapias anti-tumorais mais específicas e menos tóxicas uma vez que interagem na resposta imune do paciente. (Whiteside, 2005).

A resposta anti-tumoral é composta por elementos da imunidade inata e imunidade adaptativa. Dentro da resposta inata destacam-se os macrófagos e as células *natural killer* (NK). Os macrófagos presentes nos tumores são reprogramados, perdendo sua função de célula apresentadora de antígenos e inibem o funcionamento dos linfócitos através da liberação de IL-10, prostaglandinas e radicais livres de O₂ facilitando a progressão tumoral (Lin, 2001). As células NK reconhecem células tumorais que não expressam MHC, mecanismo de evasão da resposta imune, liberando as perforinas e levando à destruição e morte celular (Abbas, 2000). Entretanto muitas células tumorais são resistentes à ação destas perforinas, evadindo-se da resposta imune (Whiteside, 2003). O tecido tumoral é preenchido por linfócitos infiltrantes de tumor (LIT), responsáveis por um importante mecanismo de evasão da imunidade pelos tumores (Rosemberg, 2000). As células NK são dependentes de estímulo promovido pela IL-2, como esta citocina é suprimida no ambiente tumoral, tais linfócitos raramente compõe

os LIT, aparecendo apenas em lesões pré-malignas ou iniciais (Whiteside, 2003).

Entre os efetores da resposta adaptativa destacam-se os linfócitos B e T. Atualmente considera-se como objetivo final da maioria das imunizações contra o câncer a geração de linfócitos T antígeno-específicos. Neste contexto as células dendríticas ou células apresentadoras de antígenos profissionais tem posição central. Elas capturariam antígenos tumorais e apresentariam estes aos linfócitos T CD4+ ou CD8+ juntamente com as moléculas do MHC classes I e II, gerando uma resposta citotóxica antitumoral efetiva. Os sinais de ativação das células dendríticas são representados pelas citocinas pró-inflamatórias como IL2, IFN γ , TNF α e GMCSF. As células dendríticas ativadas e efectoras são fundamentais para quebrar a tolerância aos antígenos tumorais que são reconhecidos como próprios. Entretanto no microambiente tumoral predominam citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF β que predispõe à tolerância imunológica (Abbas, 2000).

Após a apresentação de antígenos, os linfócitos T CD4+ estimulam os linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos e produzirem anticorpos contra tais antígenos tumorais (Abbas,2000). Os linfócitos B não são muito freqüentes entre os linfócitos infiltrantes de tumor (Whiteside, 2003).

Por todos estes motivos supracitados alguns autores comparam o sítio tumoral a um sítio de imunoprivilégio (Igney, 2002).

A partir destes conhecimentos da imunologia básica já são pesquisadas em ensaios fase 1 múltiplas estratégias que visam interromper

os mecanismos de evasão tumoral, como por exemplo vacinas com células dendríticas transfectadas, vacinas contendo epitopos tumorais dominantes e vacinas com antígenos e citocinas pró-inflamatórias (Disponível em: <http://www.clinicaltrials.gov>).

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

Geluk *et al.* identificaram seqüências comuns entre o MHC classe 2 de diversos primatas e o *Homo Sapiens* e demonstraram que segmentos importantes para a ligação com o peptídeo de algumas moléculas de HLA-DR permaneceram inalterados por cerca de 30 milhões de anos. Essas moléculas se ligam a peptídeos derivados do *M. tuberculosis* e *M. leprae* (Geluk, 1993), inclusive peptídeos derivados da HSP65 do *M. leprae*, demonstrando que esta proteína é um epitopo importante e pode ter tido um papel na pressão evolutiva do MHC dos primatas. Um grande corpo de evidências sugere que as infecções, tais como lepra e tuberculose, vêm esculpindo o sistema imune no decorrer de milhões de anos. Isto é reforçado pelo fato de que populações isoladas da tuberculose, como por exemplo os índios Yanomamis da selva amazônica, são especialmente sensíveis a esta infecção e respondem mal mesmo quando previamente vacinados (Souza, 1997). A presença de uma alta frequência de linfócitos reagindo contra antígenos do *Mycobacterium sp* e de uma estrutura de apresentação de

antígenos preparada para tal é explorada dentro da imunologia para a utilização destes antígenos como adjuvantes em imunizações (Jenneway,2007).

Antígenos derivados do *Mycobacterium sp* vêm sendo utilizados há muitos anos pelos pesquisadores de imunologia como adjuvantes na indução da resposta imune, principalmente celular. Para ilustrar este mecanismo poderemos citar o fato de que a imunização com antígenos derivados do colágeno ou da mielina somente causam artrite ou encefalite autoimune quando misturados com antígenos do *M. tuberculosis* (Jenneway,2007).

O BCG (*Mycobacterium bovis*) também é utilizado clinicamente e com sucesso no tratamento do câncer de bexiga precoce. O uso intravesical de BCG já é prática consagrada no tratamento do câncer de bexiga (Abraham, 2001). Os exemplos de como os antígenos do *Mycobacterium sp* podem ser utilizados como adjuvantes da resposta imune são inúmeros e este conceito é bem estabelecido dentro da imunologia (Rosemberg, 2000).

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

A vacinação com DNA protege camundongos contra desafios infecciosos como tuberculose e estabelece uma resposta imune celular antígeno-específica que é tanto citotóxica quanto produtora de IFN- α representada pelos linfócitos T CD8+ e CD4+ respectivamente. Este padrão

é considerado o ideal na indução de uma resposta anti-tumoral efetiva (Toes, 1999; Pardoll, 2000). A eficácia da vacina de DNA no tratamento da tuberculose foi tão grande que pela primeira vez se demonstrou que uma vacina de tuberculose possuía uma atividade coadjuvante terapêutica efetiva [Lowrie, 1999].

A resposta anti-tumoral depende muito do linfócito CD4+ (Toes, 1999) e a célula apresentadora de antígenos desempenha um papel fundamental na sensibilização do linfócito T selvagem (*naive*), sendo a célula dendrítica a única célula descrita que tem a capacidade de sensibilizar linfócitos selvagens (Benchereau, 1998 e 2000; Lotze, 2000).

Dados mais recentes sugerem que a interação dentro de agrupamentos de células é importante na definição e no comprometimento final de uma célula T *naive* em Th1 ou Th2 (Schuhbauer, 2000). A apresentação de antígenos ocorre em pequenos grupos de células e é possível imaginar que a apresentação de antígenos derivados do *Mycobacterium sp* apresentados pela mesma célula dendrítica (ou por uma no mesmo agrupamento) pode contaminar o tipo de resposta a outros antígenos apresentados localmente, principalmente se houver um grande número de células dendríticas infiltrando o local e estas estiverem devidamente ativadas e produzindo IL-12 (Akbari, 1999). .

O mecanismo pelo qual esta vacina de DNA induz uma resposta imune é pouco claro, porém estudos mais recentes demonstram que a ativação e a transfecção das células dendríticas é um evento fundamental na indução da resposta imune (Akbari, 1999). A indução de uma resposta imune celular

citotóxica (CD8+) também foi claramente demonstrada com esta vacina (Lowrie, 1999).

Parte importante do efeito adjuvante das vacinas de DNA devem-se ao seu conteúdo de seqüências CpG não-metiladas que induzem a secreção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos locais. Esta citocina promove a aquisição de um fenótipo tipo 1 (Th1) e citotoxicidade durante a apresentação e maturação dos linfócitos T adjacentes, independentemente da sua especificidade (Lowrie, 1999). Estas seqüências CpG também estimulam o recrutamento de macrófagos e monócitos, representantes da imunidade inata. Porque expressam em sua superfície os hTLR9 (*human toll like receptor 9*) que se ligam especificamente as seqüências CpG estimulando a resposta imune local contra o DNA inoculado (Takeshita, 2001).

Lukacs et al. demonstraram que a inserção *ex vivo* do gene da HSP65 do *M. Leprae* em linhagens de células tumorais resultou na incapacidade destas células de induzir tumores após inoculadas em camundongos imunocompetentes. Este grupo também descreve que a transfecção do mesmo gene *in vivo* causou a regressão de modelos experimentais de tumores altamente agressivos. Isto ocorreu somente em camundongos imunocompetentes e não em camundongos com imunodeficiência combinada grave, sugerindo que a presença de células T mediaram a resposta anti-tumoral e erradicaram o tumor após estímulo da vacina com o DNA da HSP 65 do *M. leprae* (Lukacs, 1997). Tais dados sugerem que a

utilização de HSP65 do *M.leprae* pode ser uma nova abordagem no tratamento de tumores estabelecidos.

Lukacs et al. também demonstraram que a utilização de uma linhagem de células tumorais - sarcoma J774 - transfectada com o gene do HSP65 do *M. leprae* (*Cell line* J774-HSP65) também induziu proteção contra o crescimento de tumores da linhagem original que não expressava o gene HSP65, a linhagem pura. Tal observação demonstra que a resposta imune contra o tumor não se dirige exclusivamente a epitopos da HSP65 e esta resposta se estende contra outros antígenos, indicando que a HSP65 predispõe a quebra da tolerância imunológica aos antígenos tumorais, fornecendo o racional de uma indução de resposta cruzada na transfecção de um tumor com antígenos do *M.leprae* (Lukacs,1993). Neste mesmo estudo demonstrou-se in vitro que linfócitos T de camundongos vacinados com a linhagem singênica J774-HSP65 eram citotóxicos para células da linhagem original J774, corroborando com a hipótese de resposta cruzada (Lukacs, 1993). Por este motivo a terapia com HSP65 não requer grande nível de expressão gênica pois relativamente poucas células tumorais transfectadas são capazes de induzir resposta imune eficaz, o que constitui uma grande vantagem considerando-se as limitações impostas pela sua alta tecnologia e custo de produção. A HSP65 é uma *chaperona* e por esta função facilita a apresentação de antígenos tumorais aos linfócitos T , capacitando-os para eliminar células tumorais transfectadas (Lukacs, 2000).

Todos estes dados experimentais demonstram que a transfecção do HSP65 do *M.leprae* induz uma resposta contra a HSP 65 e antígenos

tumorais e que esta propriedade desta vacina pode ser utilizada para novas abordagens no tratamento de tumores em seres humanos.

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

O risco de indução ou aceleração de uma doença autoimune com o uso de uma vacina de DNA foi estudado extensamente em modelos murinos. Nos experimentos com camundongos houve detecção de um aumento do título de anticorpos anti-DNA que não foi acompanhado de nenhum sinal de doença autoimune sistêmica como revisto em White e cols (White, 2000). Estudos clínicos de Fase 1 em humanos pesquisaram atentamente o surgimento de qualquer sinal de autoimunidade ou de anticorpos anti-DNA e nenhum destes foi detectado (White, 2000). Diversos ensaios clínicos com vacinas de DNA já estão em andamento no momento, entre estes incluímos as vacinas para: AIDS, Hepatite B, Herpes, Influenza, Malaria, Câncer de Colon, Linfoma e melanoma (Disponível em <http://www.clinicaltrials.gov>; Rosemberg, 2000). As vacinas de DNA tem sido associadas a reações típicas do uso de vacinas (febre, adenomegalia, reação local), porém não houve relatos de reações graves com risco de vida para o indivíduo (White, 2000). Outro ponto importante é que síndromes autoimunes demoram anos para se desenvolverem e a sobrevida ou tempo de acompanhamento dos pacientes com câncer avançado não permitem observar tais acontecimentos.

A vacina de DNA pode teoricamente induzir a uma mutação e ser oncogênica. Entretanto, este risco teórico não foi demonstrado em nenhum

modelo experimental (White, 2000). Além disso, a utilização generalizada de vacinas contendo vírus de DNA replicantes (Varíola) não foi associada a oncogênese e possui teoricamente risco similar a uma vacina de DNA (Rosemberg, 2000; White, 2000).

A HSP65 é uma proteína da família das HSP60 gerada em condições de estresse oxidativo, com potente ação imunogênica e que conserva grande homologia entre as diferentes espécies. Entretanto Lukacs, uma das principais pesquisadoras desta área, refere que nos seus estudos de sobrevivência em longo prazo nenhum animal desenvolveu sinais de doença autoimune e cita outros estudos que demonstraram os benefícios da HSP65 em prevenir artrite reumatóide [Lukacs, 2000].

O uso de uma vacina de HSP65 pode teoricamente induzir uma resposta contra a proteína e não se sabe se isto poderia levar a uma resposta cruzada contra proteínas semelhantes no *Homo Sapiens*. Um estudo demonstra a presença de uma resposta imune com formação de anticorpos contra antígenos HSP 65 e 70 (HSP das espécies estudadas) em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico e em animais com LES experimental. Entretanto, não houve correlação clínica entre a atividade da doença e os títulos dos anticorpos, sugerindo que os anticorpos são um epifenômeno da doença e que não participam da resposta imune (Faulds, 1995).

O risco de indução ou aceleração de uma doença autoimune com o uso de uma vacina de DNA foi estudado extensamente em modelos murinos.

Nos experimentos com camundongos houve detecção de um aumento do título de anticorpos anti-DNA que não foi acompanhado de nenhum sinal de doença autoimune sistêmica como revisto em White e cols (White, 2000). Estudos clínicos de Fase 1 em humanos observaram atentamente o surgimento de qualquer sinal de autoimunidade ou de anticorpos anti-DNA e nenhum destes foi detectado (White, 2000). Diversos ensaios clínicos com vacinas de DNA já estão em andamento no momento, entre estes incluímos as vacinas para: AIDS, Hepatite B, Herpes, Influenza, Malária, Câncer de Cólon, Linfoma e Melanoma (www.clinicaltrials.gov; Rosemberg, 2000). As vacinas de DNA tem sido associadas a reações típicas do uso de vacinas (febre, adenomegalia, reação local) porém não houve relatos de reações graves com risco de vida para o indivíduo (White, 2000). Outro ponto importante é que síndromes autoimunes demoram anos para se desenvolverem e a sobrevida dos pacientes com câncer avançado não permitem observar tais acontecimentos.

A vacina de DNA pode teoricamente induzir a uma mutação e ser oncogênica. Entretanto, este risco teórico não foi demonstrado em nenhum modelo experimental (White, 2000). Além disso, a utilização generalizada de vacinas contendo vírus de DNA replicantes (Varíola) não foi associada a oncogênese e possui teoricamente risco similar a uma vacina de DNA (Rosemberg, 2000; White, 2000).

A HSP65 é uma proteína da família das HSP60 gerada em condições de estresse oxidativo, com potente ação imunogênica e que conserva grande homologia entre as diferentes espécies. Entretanto Lukacs, uma das

principais pesquisadoras desta área, refere que nos seus estudos de sobrevivência a longo prazo nenhum animal desenvolveu sinais de doença autoimune e cita outros estudos que demonstraram os benefícios da HSP65 em prevenir artrite reumatóide (Lukacs, 2000).

O uso de uma vacina de HSP65 pode teoricamente induzir uma resposta contra a proteína e não se sabe se isto poderia levar a uma resposta cruzada contra proteínas semelhantes no *Homo Sapiens*. Um estudo demonstra a presença de uma resposta imune com formação de anticorpos contra antígenos HSP 65 e 70 (HSP das espécies estudadas) em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) e em animais com LES experimental. Entretanto, não houve correlação clínica entre a atividade da doença e os títulos dos anticorpos, sugerindo que os anticorpos são um epifenômeno da doença e que não participam da resposta imune (Faulds, 1995).

O conhecimento que a proteína recombinante HSP65 do *M.leprae* é um antígeno importante e induz uma resposta celular e humoral em pacientes com hanseníase e em contactuantes saudáveis destes pacientes sugere que a reatividade cruzada entre esta proteína e outras proteínas humanas é improvável, pois não houve nenhuma descrição de eventos autoimunes, decorrentes diretamente da infecção, nestes pacientes (Ilangumaran, 1994). Entretanto, teoricamente, a apresentação de tal proteína através de uma vacina de DNA não necessariamente é a mesma da infecção natural. A vacina pode ser muito mais imunogênica e induzir uma resposta autoimune mesmo que a infecção natural não a induza. Por isso foram fundamentais a

avaliação clínica minuciosa e realização de exames complementares pertinentes, rastreando a ocorrência de eventos autoimunes nos pacientes deste protocolo.

2.6 Como realizar um estudo clínico - Fase 1

Nesta fase 1 estuda-se um pequeno grupo de pacientes nos quais se utiliza uma droga pela primeira vez em seres humanos, visando determinar sua segurança para uso clínico, identificar os Eventos Adversos (EA) decorrentes deste tratamento e definir qual a dose segura para aplicação na fase 2 (Disponível em <http://www.clinicaltrials.gov>).

Estudos prévios em animais fornecem as seguintes informações:

- dose inicial para ensaios clínicos;
- previsão de possíveis efeitos nos tecidos normais aos quais o investigador deverá ficar atento.

Na Fase 1 aumenta-se a dose gradativamente, através de procedimento previamente definido pelo protocolo do estudo, até atingir dose limite tolerável de toxicidade conforme o *Common Terminology Criteria of Adverse Events* versão 3.0, 2003 (anexo) e/ou sinais clínicos de ação terapêutica.

Selecionam-se pacientes com doença maligna comprovada sem resposta satisfatória a terapia convencional ou sem tratamento padronizado possível. Tais indivíduos devem ter as funções orgânicas preservadas.

O cronograma de administração é determinado por diversos fatores incluindo: evidências de cronogramas em estudos experimentais in vivo, farmacocinética, mecanismo de ação e dados clínicos relevantes se existirem.

A dose inicial geralmente equivale a 1/10 da dose em camundongos em mg/m² de superfície corpórea, quando não for tóxica para nenhuma espécie testada. Quando houver tal toxicidade a dose inicial é a mínima que não demonstrou produzir mais do que efeitos mínimos e reversíveis na espécie mais sensível testada.

Os Princípios do ICH (*Internacional Conference on Harmonization*), tem a função de uniformizar o desenvolvimento de medicamentos na Europa, Estados Unidos e Japão, adotados neste estudo são descritos abaixo (ICH, 1996).

1. Um ensaio clínico deve desenvolver-se de acordo com os princípios éticos presentes na Declaração de Helsinki e elaborado seguindo “*Good Clinical Practices*” e a legislação local, no caso a brasileira através da resolução nº 196 de 1996.

2. O extenso conhecimento e discussão pela equipe dos possíveis benefícios do novo tratamento comparando-se com os riscos, antes de ser oferecido aos pacientes.

3. O bem-estar, a segurança e os direitos do paciente são considerados antes dos interesses da ciência e sociedade, por mais que interfiram no cronograma previsto pela pesquisa.

4. Revisão extensa dos dados pré-clínicos do produto que confirmem seu possível benefício ao sujeito da pesquisa.

5. Descrição minuciosa de todos os procedimentos a serem realizados com o paciente no Protocolo do estudo.

6. Aprovação do estudo pelos órgãos responsáveis.

7. Disponibilização de equipe médica qualificada para atender a qualquer momento o paciente em estudo.

8. Numa equipe multiprofissional e multidisciplinar cada integrante deverá ser treinado para o melhor desempenho de sua função.

9. Fornecer o termo de consentimento livre e esclarecido previamente à inclusão no estudo.

10. Todas as informações coletadas durante o ensaio clínico são coletadas de maneira clara facilitando auditoria futura e armazenadas de forma segura.

11. Manutenção da confidencialidade dos dados respeitando o sigilo das informações de cada paciente.

12. A garantia que a vacina é produzida em “*Good Manufacturing Practices*” e segue os cuidados adequados para manipulação, conservação e armazenamento.

O Protocolo do estudo foi baseado nas diretrizes do *National Cancer Institute (NCI)* através do *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0*, desenvolvido em 1982 para relatar a ocorrência de EA, estudar tais eventos e reportar as novas drogas em investigação no FDA (Food and Drug Administration). O CTCAE é amplamente utilizado para

coletar dados de EA relacionados a novos tratamentos para facilitar a avaliação das novas terapias em câncer, diferentes modalidades terapêuticas e medidas de suporte. A versão original do CTCAE continha quarenta e nove EA agrupados em dezoito categorias, atualmente são 272 eventos adversos subdivididos em 28 categorias, estes incluem sinais e sintomas clínicos e alterações de valores laboratoriais, como p. ex.: insuficiência renal, disfunção palpebral, vômitos, reação anafilática, contagem de linfócitos CD4+, alteração da gamaglutamil transferase sérica. Como, constantemente, são observados novos eventos, periodicamente um grupo responsável se reúne para atualizar este manual. Diferentes populações (crianças e adultos) e terapias são estudadas, como quimioterapia, terapia biológica, radioterapia e cirurgia, então o CTCAE tem o cuidado de graduar de forma diferente um determinado EA de acordo com a população estudada e a terapia da qual foi decorrente.

De acordo com a Resolução nº 196 de 1996 Conselho Nacional de Saúde que regulamenta a ética em pesquisa clínica, os ensaios da Fase 1 além da aprovação do Comitê de Ética Local (CAPPesq), necessitam ter aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e por utilizar organismos geneticamente modificados serem validados pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) e Comissão Nacional de Biossegurança (CTNBio).

A causa do EA também é considerada da seguinte forma: na categoria sintomas constitucionais estão presentes ganho e perda de peso separadamente. Quando a alteração de peso é devida a ascite, edema

periférico, desidratação, vômito ou diarreia, deve-se graduar além da alteração do peso a causa responsável, exceto que esta variação for diretamente relacionada ao tumor.

Evento Adverso é qualquer sintoma, sinal, doença ou dado laboratorial anormal desfavorável ou não intencional, temporariamente associado ao uso do tratamento ou procedimento médico estudado, que por sua vez pode ou não ser considerado decorrente de tal procedimento.

Todo evento adverso é graduado de 0 a 5, sendo assim designado:

0 = nenhum ou dentro dos limites normais

1 = EA leve

2 = EA moderado

3 = EA grave e indesejável

4 = EA debilitante ou proporcionando risco de morte

5 = morte secundária ao EA

Esta graduação é feita pelo médico responsável e baseada em critérios clínicos bem definidos. Não são graduados sinais de progressão da doença ou sintomas decorrentes definitivamente da doença estudada.

A atribuição de causalidade é muito importante para distinguir condições relacionadas ao tratamento daquelas decorrentes da progressão da doença. Sendo definida de acordo com os seguintes critérios:

Relacionado: quando o EA claramente é relacionado ao agente investigado.

Provavelmente relacionado: quando o EA é muito provavelmente relacionado ao agente investigado.

Possivelmente relacionado: quando o EA pode estar relacionado ao agente investigado.

Improvemente relacionado: quando o EA duvidosamente é relacionado ao agente investigado.

Não relacionado: quando o EA claramente não é relacionado ao agente investigado.

É da responsabilidade dos pesquisadores definirem a toxicidade esperada. Nesta pesquisa definiu-se como EA esperado:

- Febre, adenomegalias, aumento da astenia, dor no local da injeção;
- Pequeno sangramento local imediatamente após a injeção intratumoral (com volume inferior a 50ml);
- Aumento do volume do tumor e outros sinais de inflamação tumoral.
- Reação de hipersensibilidade;
- Doença autoimune.

Conduta frente a eventos adversos esperados:

- Toxicidade graus 1 e 2 – tratamento do paciente e discussão na reunião regular quinzenal da equipe de médicos nuclear.
- Toxicidade graus 3 e 4 - tratamento do paciente e suspensão de inclusão de novos casos até discussão rápida do evento com toda a equipe.

A determinação de que certo evento adverso é dose-limitante é determinada pelo protocolo do estudo, apesar de ser conveniente assumir que eventos graus 3 devam limitar a subida de dose da medicação, sempre deve-se comparar o EA com o benefício secundário. A dose máxima

tolerada é definida como a dose inferior à dose que ocasionar toxicidade graus 3 ou 4 em um terço dos pacientes.

Neste protocolo definiu-se como toxicidade limitante a ocorrência de EA graus 3 e 4 e a conduta estabelecida foi a seguinte:

- EA esperado graus 3 e 4: reescalonar para baixo a dose.
- EA inesperado graus 3 e 4: suspender a inclusão de novos casos até esclarecimento do evento, se claramente for relacionado ao tratamento escalonar a dose para baixo e em caso duvidoso ou não relacionado ampliar o n de indivíduos.

3. Pacientes e Métodos

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

No presente estudo, prospectivo, não randomizado, aberto e não controlado foram selecionados pacientes portadores de carcinoma epidermóide do trato aéreo-digestivo alto sem outra opção terapêutica curativa possível, para serem tratados com a vacina de DNA da HSP65 do *M.leprae*. Previu-se um número (n) de 18 pacientes subdivididos em 3 grupos de 6 pacientes. Cada paciente recebeu 3 doses da vacina, aplicadas através de injeção intratumoral, nos tempos 0, 21^o e 42^o. Os pacientes foram subdivididos e em cada grupo recebiam doses diferentes da vacina, da seguinte forma:

Grupo A (n=6): 3 doses de 150 µg

Grupo B (n=6): 3 doses de 600 µg

Grupo C (n=6): 3 doses de 1200 µg

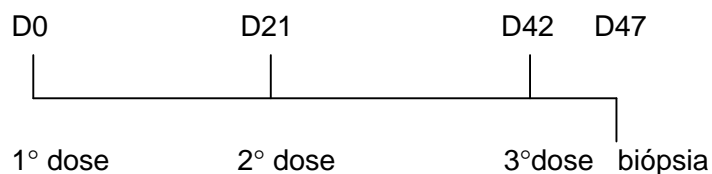


Figura 1 – Cronograma de aplicação da vacina

3.2 Critérios de Elegibilidade

Os critérios de inclusão são clínicos e cirúrgicos. Os pacientes considerados elegíveis receberam informações detalhadas sobre o estudo e concordaram com a sua inclusão no mesmo após o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

O paciente, com doença refratária ao tratamento convencional, após avaliado pelo cirurgião de cabeça e pescoço e considerado fora de possibilidades terapêuticas curativas, seria submetido à verificação dos critérios de elegibilidade (inclusão ou exclusão) para o estudo, conforme se segue:

a) Critérios de inclusão no estudo:

- Idade maior que 18 anos.
- Compreender claramente e concordar com o estudo assinando o consentimento informado.
- Karnofsky acima de 70% (anexo C).
- Expectativa de vida aproximada maior que três meses.
- Diagnóstico histológico de carcinoma epidermóide do trato aéreo-digestivo alto.
- Doença sem terapêutica curativa possível.
- Massa cervical irressecável de acordo com os seguintes critérios: a) invasão da base do crânio; b) invasão da fáscia pré-vertebral; c) invasão da musculatura profunda do pescoço; d) invasão da artéria carótida interna ou comum.

- Ausência de doença pulmonar debilitante.
- Creatinina inferior a 2mg/dL.
- Ausência de sinais clínicos de insuficiência cardíaca descompensada.
- Ausência de neutropenia, plaquetopenia ou anemia grave (hematócrito menor que 35%).
- Mais de um mês desde o último tratamento radioterápico.
- Mais de um mês desde a última dose de quimioterapia.
- Mais de um mês desde a última cirurgia.
- Ausência de infecções concomitantes.
- Ausência de outras doenças malignas (exceto carcinoma basocelular de pele localizado).
- Sem terapia biológica prévia (p.ex. terapia gênica baseada em vírus ou DNA recombinante).
- Sem doenças auto-imunes sistêmicas (p.ex. Chron, Doença Reumatóide).
- Sem antecedente de doença psiquiátrica (exceto depressão controlada).
- Se o paciente for do sexo feminino, deverá ser não gestante e pacientes em idade fértil devem ter teste de gravidez negativo e usar anticoncepcional.

Os critérios de exclusão são:

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



Figura 2 – Foto de paciente estudado

3.3 Vacina de DNA HSP65 do *Mycobacterium leprae*

Método de definição da qualidade dos lotes da vacina para os ensaios clínicos da vacina de DNA-HSP65 *M. leprae* (Avaliação microbiológica e de contaminantes.)

O método empregado na definição da segurança do uso clínico foi o correntemente utilizado na formulação de materiais biológicos. O produto foi testado quanto a presença de fungos, vírus, bactérias e pirógenos. Serviço foi realizado no Laboratório de Vacinas Gênicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto sob a responsabilidade do Farmacêutico José

Maciel Rodrigues Júnior respeitando a regulamentação da Agencia Nacional de Vigilância Sanitaria (ANVISA).

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

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

a. Estabelecimento de um Banco de Células de Referência (BCR) visando assegurar a identidade e pureza do material de partida do lote de DNA a ser obtido(:

Montou-se o BCR a partir de uma única colônia de bactéria após caracterização pelos testes descritos no item g. Para tal, *E. coli* DH5 α transformada com o plasmídeo de interesse foi cultivada a 37°C em meio LB agar contendo antibiótico como marcador de seleção. Uma das colônias desenvolvidas era removida da placa e expandida em meio LB líquido contendo antibiótico. Esta cultura foi dividida em diversas alíquotas futuramente criarmazenadas a -70°C ou em nitrogênio líquido dando origem ao BCR.

b. Estabelecimento do Protocolo de Fermentação (PF) a fim de otimizar os critérios de qualidade e rendimento em larga escala:

Preparou-se um pré-inóculo onde uma alíquota do BCT era rapidamente descongelada a 37°C e assepticamente inoculada em meio LB contendo antibiótico. Esta amostra era incubada a 37°C sob agitação.

Durante o meio da fase exponencial de crescimento, uma alíquota desta cultura inicial era retirada e diluída em meio LB contendo antibiótico. Como na etapa anterior, o procedimento de crescimento era repetido e, quando a cultura atingia o meio da fase exponencial de crescimento, ela era utilizada para inocular o fermentador. O cultivo nesta fase foi feito em um fermentador de 50 litros.

c. Fermentação:

A fermentação era realizada a 37°C sendo que as condições de pH, aeração, formação de espuma, nível de produção de rejeito dentre outros fatores que poderiam afetar a produção de biomassa deveriam ser monitoradas experimentalmente e controladas de forma a alcançar uma eficiente expressão do produto desejado. As células foram coletadas, de forma asséptica, no final da fase exponencial de crescimento e armazenadas a -70°C.

d. Otimização da recuperação de DNA pela lise em meio alcalino:

Para realizar a lise alcalina, as células eram descongeladas e resuspensas em um tampão específico. Após serem homogeneizadas, o tampão de lise era adicionado e a suspensão era homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Após incubação, o tampão de neutralização era adicionado e após homogeneização, a suspensão era filtrada em membrana de nylon e o filtrado coletado. Embora os volumes dos tampões de resuspensão, lise e neutralização devessem ser equivalentes, a determinação dos mesmos era feita experimentalmente monitorando o

rendimento do plasmídeo e o nível de contaminação do mesmo em função da biomassa.

e. Estabelecimento do processo de purificação pela combinação de técnicas cromatográficas:

Nesta etapa eram utilizadas, para fins de otimização, três resinas e misturas das mesmas. Esta etapa não será detalhada neste momento devido a motivos de proteção industrial.

f. Validação do processo será assegurada pela avaliação do produto final em:

1) gel de agarose e análise de restrição: a presença do inserto no plasmídeo era verificada pela digestão deste com enzimas de restrição. Três μg de cada plasmídeo (pVAX e pVAX-hsp65 foram utilizados como modelo nesta fase) eram incubadas com 20 unidades de Bam H1 (Pharmacia Biotech) a 30°C por 3 horas. Em seguida, 10 unidades de Not 1 (Amersham Life Science) eram adicionadas a cada amostra. Após 3 horas de incubação a 37°C , o produto da digestão de cada amostra, bem como plasmídeos não digeridos, eram submetidos à eletroforese em gel de agarose (SIGMA) a 1%. A corrida foi realizada a 60 V por 3 horas em aparelho Horizon TM11.14 (BRL) 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL) utilizado como marcador de peso molecular. O gel era corado com brometo de etídio e a visualização das bandas feita em luz ultravioleta no ImageMaster VDS (Pharmacia Biothech);

2) medida da absorbância DO 260/280: A quantificação dos plasmídeos era feita por espectrofotometria em $\lambda = 260/280\text{nm}$ no aparelho Gene Quant II (Pharmacia Biotech);

3) teste de endotoxina: a avaliação da contaminação por

endotoxina era realizada utilizando-se o método LAL;

4) determinação da expressão da proteína recombinante: a capacidade do pVAX-hsp65 em expressar a hsp65 em células de mamíferos era avaliada pela transfecção de células HeLa (Human epitheloid cervical carcinoma) e células J774 (macrófagos de linhagem tumoral originários de camundongos BALB/c) utilizando o Lipofectin® (GIBCO BRL) como agente de transfecção. Células J774-hsp65 (células J774 transfectadas com o vetor retroviral [pZIPNeoSV(x)] carreando o gene da hsp65 de *M. leprae*) serão utilizadas como controle positivo do ensaio. As células eram cultivadas em meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 2% de soro fetal bovino inativado por aquecimento, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. 100µL da suspensão de células (5x10⁵ células) eram adicionados à superfície de lamínulas estéreis em placas de 24 poços e incubados por 3 horas para permitir a adesão celular. Após a incubação, as células eram tratadas como a seguir:

- células J774 e HeLa receberão 1mL de meio RPMI servindo como controle negativo da expressão de hsp65
- células J774-hsp65 receberão 1mL de meio RPMI servindo como controle positivo da expressão de hsp65
- células J774 e HeLa receberão 1 mL de meio RPMI contendo pVAX-hsp65 complexado com Lipofectin® (GIBCO BRL) segundo instruções do fabricante.
- após 24 horas de incubação, os sobrenadantes das culturas serão removidos e repostos com 1 mL de meio RPMI contendo 10% de soro

fetal bovino. Análises de RT-PCR e imunocitoquímica realizadas 48 e 72 horas, respectivamente, após o início do teste.

- RT-PCR: o RNA total era isolado das células por extração em Trizol (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) e precipitação em álcool seguida por um tratamento adicional com Dnase I (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) para evitar contaminação com DNA genômico e plasmidial. A amplificação por PCR era realizada utilizando pares de primers específicos da hsp65 de *M. leprae* (sense 5'-ATG-GCC-AAG-ACA-ATT-GCG-TAC-3'; antisense 5'-TTG-AGC-AGG-TCC-TCG-TAC-TCA-c-3') dando uma banda de 1.4 kb). A PCR será conduzida preparando-se 50 µL da mistura como se segue: 0.5 µL de cada primer 5' e 3' na concentração de 100µM, 5 µL de tampão 10X da enzima Taq, 0.5 µL de Taq polimerase a 5 UI/µL (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 1 µL de dNTP a 10 mM; e 2 µL da amostra. A mistura era submetida a 30 ciclos de amplificação em um termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc, Watertown, MA, USA). Em cada ciclo, a desnaturação era a 96°C por 45 segundos, o anelamento dos primers para formar o cDNA será conduzido a 60°C por 45 segundos, e a extensão será a 72°C por 90 segundos. O RNA mensageiro para β-actina era detectado por PCR (sense 5'-GTG-GGC-CGC-TCT-AGG-CAC-CAA-3'; antisense 5'-CTC-TTT-GAT-GTC-ACG-CAC-GAT-TTC-3'; dando uma banda de 902 bp) a fim de normalizar os níveis de RNA nas diferentes amostras. Os produtos da PCR eram visualizados por iluminação ultravioleta após eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídio;

- **Imunocitoquímica:** para sua realização as células eram lavadas por três vezes consecutivas em solução de PBS 0,01M, pH 7,2 contendo 1% de soro albumina bovina (BSA) (SIGMA). Em seguida elas eram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos à temperatura ambiente, e lavadas novamente. Todas as lavagens serão realizadas por três vezes consecutivas. Posteriormente, realizava-se o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação com PBS contendo 3% de H₂O₂ por 30 minutos à temperatura ambiente. Após as lavagens com PBS-BSA 1%, as células eram incubadas com tampão de bloqueio (3 % de soro de coelho, 1% de BSA e 0.01% de Triton X 100) por 1 hora à temperatura ambiente a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Em seguida, o anticorpo anti-hsp65 era adicionado e as células incubadas em câmara úmida a 4°C durante a noite . Após as lavagens consecutivas era feita a incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à biotina (B-7022, Sigma) por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens as lamínulas eram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com o complexo streptoavidina biotina – peroxidase (Streptoavidin –Dako Corporation, CA-USA). Após a lavagem as reações eram reveladas utilizando-se o substrato 3-3'-Diaminobenzidina (SIGMA) (5mg em 10 ml de PBS) adicionado a 180µ de H₂O₂ (20 volumes). A revelação foi feita por 10 a 20 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. As reações foram interrompidas com água destilada e as lamínulas contra-coradas com hematoxilina de Mayer previamente filtrada, por 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada por duas

vezes, azuladas com água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5%) e, novamente lavadas com água destilada, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e montadas em lâminas com Bálsamo do Canadá. O controle negativo das reações foi realizado através da substituição dos anticorpos primários por PBS ou isotipos de imunoglobulinas não relacionados. A documentação da citoquímica foi realizada em microscópio Aristoplan (Leitz), acoplado ao sistema de fotografia MC80DX, e a análise foi realizada com auxílio do programa Image-pro Plus versão 3 para Windows após a captação da imagem da microscopia por meio de câmara digital SONY CCD-IRIS acoplada ao microscópio.

- avaliação da contaminação por RNA e por DNA genômico: era feita por eletroforese em gel de agarose.
- testes de esterilidade: realizados de acordo com procedimentos farmacopeicos.

3.4 Protocolo do estudo

3.4.1 Cronograma da aplicação da vacina

Os pacientes foram divididos em três grupos e receberam as seguintes doses: 150µg no primeiro grupo (Grupo A) com 6 pacientes, 600 µg no segundo grupo (Grupo B) com 6 pacientes e 400 µg no terceiro grupo (Grupo C) com 9 pacientes. O intervalo entre as três doses é de 21 dias (figura 1).

Considerando-se que a dose máxima tolerada é definida como a dose inferior à dose que ocasionar toxicidade relacionada graus 3 ou 4 em um terço dos pacientes.

A dose inicial foi calculada baseando-se na razão de cálculo por peso nos modelos animais. Dados preliminares em outros ensaios com vacinas de DNA sugerem que doses de 0,5 a 4 mg podem ser utilizadas com segurança por isso a dose máxima proposta foi de 1,2 mg.

Os pacientes foram submetidos a uma biópsia do tumor no local da inoculação da vacina uma semana após a terceira dose da vacina. A biópsia tumoral serviu para análise da resposta inflamatória causada pela vacina dentro do tumor, através do estudo histopatológico. Além disso, parte da biópsia foi processada para coleta de material para realização de RtPCR no tecido para verificação da presença de mRNA da HSP65 do *M. leprae*. A presença de mRNA documentará a transfecção do DNA-HSP65. Com o intuito de comprovar a eficácia da vacina em induzir uma resposta imune eficaz, realizou-se a dosagem pré e pós-vacinal dos títulos de anticorpos anti-HSP65 do *M. leprae*, por ELISA.

Os candidatos foram avaliados segundo os critérios de elegibilidade já mencionados. Antes da confirmação da inclusão no estudo realizou-se exames laboratoriais e de imagem para analisar as condições clínicas e comprovar o estadiamento tumoral.

Uma tomografia computadorizada helicoidal pré-tratamento não só visa a comprovação da impossibilidade de tratamento curativo, como também serve de parâmetro para avaliação da resposta tumoral. Esta

tomografia era realizada em até sete dias antes da primeira injeção, e após a biópsia de comprovação da existência da neoplasia.

Aplicava-se a vacina através de injeção intratumoral guiada por ultrassonografia. A equipe de radiologia chefiada pela Dra. Maria Cristina Chammas foi responsável por guiar as punções. Tal exame utilizava um aparelho da marca Phillips, modelo HDI 5000 ou General Electric LOGIQ 9, com transdutor de 5 a 12 MHz. Antes da aplicação era realizada uma avaliação da lesão com USG Doppler para verificar a vascularização no sítio tumoral e evitar a injeção em grandes vasos.

O volume de injeção foi fixado em 1,5ml. Após assepsia da região alvo com álcool realizamos injeção de 1,5ml da vacina, fracionada ou não dependendo das dimensões da lesão alvo. Não foi usada anestesia. Após a aplicação, o paciente permanecia internado em observação pelo período mínimo de 24 horas.

Uma semana após a terceira dose, realizava-se nova tomografia. A medição de volume do tumor na primeira e segunda tomografia seria comparada, e o tipo de resposta, determinado com base nos critérios definidos pelo Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (Anexo D), criado pela sociedade americana de radiologia.

Após a segunda tomografia realizou-se nova biópsia. O material da biópsia pré-vacinação e o da nova biópsia foi submetido à comparação anátomo-patológica e imunohistoquímica.

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

Estes dados de determinação de volume tumoral, Rt-PCR, dosagem de anticorpos anti-HSP 65 *M.leprae* e avaliação anátomo-patológica são descritos somente neste capítulo por corresponderem a temas de outras teses que avaliaram o mesmo grupo de pacientes.

3.4.2 Aplicação do CTCAE

1) Internação para exames de inclusão listados abaixo.

- Hemograma
- Coagulograma
- Sódio
- Potássio
- Cloro
- Magnésio
- Cálcio
- Fósforo
- Gasometria venosa
- Uréia
- Creatinina
- Eletroforese proteínas
- Urina 1
- Bilirrubinas totais e frações
- TGO
- TGP
- GGT
- Fosfatase alcalina
- DHL
- CPK
- Colesterol total e frações
- Triglicerídeos
- Perfil de ferro
- VHS
- PCR
- C3
- C4
- CH100
- FAN
- Anti-DNA

- Anti-TPO
- Anti-TG
- Coombs direto
- Tipagem ABO Rh
- Glicemia
- Ácido úrico
- T4 livre, T3, T4 , TSH
- PPF 1 amostra
- Sorologias: HIV, HCV, HBV, EBV, CMV, VDRL, FTABS, CHAGAS, HSV
- Linfócitos CD4, CD8
- Testes cutâneos tardios (PPD, tricofitina e candidina)
- IgE, IgA, IgM, IgG
- Rx tórax PA + PE
- ECG
- Ecodopplercardiograma
- Ultrassonografia de abdome total

2) Aplicações da vacina conforme figura 1.

3) Seguimento:

- Consultas ambulatoriais, semanalmente, até a 4ª semana após a terceira dose; posteriormente, mensais, até o óbito do paciente, sendo o período de protocolo, previsto para noventa dias. Nessas oportunidades , avaliava-se o paciente buscando possíveis Eventos Adversos, classificando-os quanto à causalidade e ao grau de acordo com o CTCAE. Consultas extras foram realizadas, em qualquer tempo, quando o paciente apresentava qualquer intercorrência.
- Coleta de exames laboratoriais listados abaixo, semanalmente, nas três primeiras semanas e após quinzenalmente para verificar lesão nos principais órgãos e sistemas. Além de coletas extras na suspeita clínica de um evento adverso ou complicação relacionada ao câncer.
- Exames periódicos para avaliação do CTCAE: Hemograma; Sódio;

Potássio; Cloro; Magnésio; Cálcio; Fósforo; Gasometria venosa; Uréia;
Creatinina; Eletroforese proteínas; Bilirrubinas totais e frações; TGO; TGP;
GGT; Fosfatase alcalina; DHL; CPK; VHS; Glicemia e Ácido úrico.

4. Resultados

4 RESULTADOS

Considerando-se que a dose máxima tolerada é definida como a dose inferior à dose que ocasionar toxicidade grau 3 ou 4 em um terço dos pacientes, como no grupo B ocorreram eventos adversos grau 3 e 4 em grande frequência optou-se por reescalonar a dose para baixo no 3º grupo utilizando 400 mcg ao invés de 1,2 mg inicialmente previsto.

No grupo C, como 3 pacientes faleceram antes de completar o protocolo, ampliou-se o n para 9, pois o último grupo deve ter, no mínimo, 6 pacientes conforme norma do CTCAE.

Portanto estudaram-se 21 pacientes portadores de CEC do trato aéreo-digestivo alto recidivado, sem possibilidades de terapêutica curativa. O grupo consistia de 18 homens (85,7%) e 3 mulheres (14,2%) e apenas 1 paciente não era tabagista e etilista.

Destes 21 pacientes selecionados oito faleceram antes de completar os três meses de protocolo, por causas secundárias à progressão tumoral, nas seguintes condições: dois deles receberam apenas a primeira dose; quatro receberam apenas 2 doses e dois receberam todas as doses, entretanto, morreram no 70º e 63º dias, respeitando-se a ordem de inclusão.

O sítio primário da doença era cavidade oral em 7 pacientes (33,3%), laringe em 7 pacientes (33,3%), hipofaringe em 2 pacientes (29,5%) e orofaringe em 5 pacientes (23,8%).

Os pacientes estudados serão descritos por grupo quanto suas características de gênero, idade, localização do tumor, estágio, volume tumoral prévio e posterior à inclusão, tratamento prévio, índice de massa corporal (IMC) prévio, índice de Karnofsky, testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (TCT) pré e pós inclusão, ocorrência de eventos adversos com sua respectiva graduação e causalidade e tempo do óbito.

Grupo A: dose = 150 µg

Tabela 1 – grupo A e distribuição por: gênero, idade, localização do tumor, classificação TNM, estágio, volume tumoral, índice de massa corporal (IMC) e índice de Karnofsky pré-tratamento e tratamento prévio ao protocolo

Paciente	Gênero	Idade	Localização do tumor	TNM	Estádio	Volume tumoral (ml)	Tratamento	IMC	Karnofsky y (%)
1	M	64	Seio piriforme	T3N3M0	IV B	52,87	RT/QT	19,92	90
2	M	59	Cavidade oral	T2N2M0	IV B	19,47	CIRURGIA/RT/QT	22,23	90
3	F	59	Cavidade oral	T4N0M0	IV A	84,36	CIRURGIA/RT	21,87	90
4	F	49	Laringe	T3N1M0	III	4,88	RT/QT	17,74	80
5	M	56	Cavidade oral	T3N1M0	III	87,05	CIRURGIA/RT	18,24	80
6	M	64	Laringe	T4N3M0	IV B	146,42	CIRURGIA/RT	17,55	80

Tabela 2 – grupo a e caracterização quanto à ocorrência de ea com respectiva graduação e causalidade; testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (TCT) pré e pós-inclusão; intervalo entre a 1ª dose e o óbito e, causa mortis

Paciente	EA 1ª dose/ grau/ causalidade	EA 2ª dose/ grau/ causalidade	EA 3ª dose/ grau/ causalidade	TCT pré	TCT pós	Tempo óbito (após 1ª dose)	Causa mortis
1*	dor local 1 relacionada, linfonodomegalia cervical 1 relacionada	nenhum	nenhum	NEGATIVO	NEGATIVO	389 dias	Progressão da doença e infestação tumoral parasitária com hemorragia extensa e choque.
2	dor local 2 relacionada, edema palpebral 1 relacionado	Dor local relacionada 2; edema 2 relacionada	dor 2 relacionada; edema 2 relacionada; erisipela 2 provavelmente relacionada	NEGATIVO	NEGATIVO	274 dias	Progressão da doença.
3	dor local 2 relacionada	dor 2 possivelmente relacionada; astenia 2 relacionada; periodontite 1 possivelmente relacionada; mucosite 1 possivelmente relacionada	dor 3 possivelmente relacionada; edema palpebral 1 relacionado; celulite 1 possivelmente relacionada	NEGATIVO	NEGATIVO	100 dias	Progressão da doença.
4	edema cervical 3 relacionado	dor 2 relacionada; afonia 3 (logo após injeção) possivelmente relacionada	dor 1 após a biopsia; edema cervical 1 relacionado; sinusite aguda 1 possivelmente relacionada; piora progressiva da dor até grau 4 e edema cervical 2 possivelmente relacionados; ganho de peso 1 possivelmente relacionado.	NEGATIVO	PPD 18 Candidina - Tricofitina -		Viva (878 dias em 10/10/06)

5	dor grau 1 possivelmente relacionada; erisipela face grau 1 possivelmente relacionada	abscesso cervical grau 2 possivelmente relacionado; astenia 2 possivelmente relacionada	astenia 3 provavelmente relacionada	NEGATIVO	NEGATIVO	148 dias	Progressão da doença.
6	dor local 2 relacionada	astenia 1 relacionada; dor 3 possivelmente relacionada		NEGATIVO	NEGATIVO	37 dias	Hemorragia induzida por manipulação da úlcera tumoral e choque hipovolêmico.

O paciente 1* como apresentou resposta ao tratamento, com redução do volume tumoral recebeu um segundo esquema de vacinas. Neste caso a continuidade da terapia em estudo foi indicada porque o paciente teve benefício com o tratamento e piora após a suspensão do mesmo, então o pesquisador é obrigado a continuar fornecendo tal esquema de tratamento. Esta norma é conhecida como *compassive use*.

Grupo B: dose = 600 µg

Tabela 3 – grupo B e distribuição por gênero, idade, localização do tumor, classificação TNM, estágio, volume tumoral, índice de massa corporal (IMC) e índice de Karnofsky pré tratamento

Paciente	Gênero	Idade	Localização do tumor	TNM	Estadio	Volume tumoral (ml)	Tratamento	IMC	Karnofsky (%)
7	M	62	Cavidade oral	T4N0M0	IV A	81,57	CIRURGIA/RT	19,25	90
8	F	73	Cavidade oral	T4N3M0	IV B	8,47	CIRURGIA/RT	17,12	90
9	M	55	Cavidade oral	T4N1M0	IV A	8,26	CIRURGIA/RT	21,91	90
10	M	65	Laringe	T4N0M0	IV A	5,63	CIRURGIA/RT/Q	22,97	90
11	M	51	Orofaringe	T4N0M0	IV A	328,1	CIRURGIA/RT/Q T	25,32	90
12	M	45	Laringe	T4N2M0	IV A	59,56	CIRURGIA/RT T	16,92	90

Tabela 4 – grupo B e caracterização quanto à ocorrência de EA com sua respectiva graduação e causalidade; testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (TCT) pré e pós inclusão; intervalo entre a 1ª dose e óbito e causa mortis.

Paciente	EA 1ª dose/ grau/ causalidade	EA 2ª dose/ grau/ causalidade	EA 3ª dose/ grau/ causalidade	TCT pré	TCT pós	Tempo óbito (após 1ª dose)	Causa mortis
7	edema 1 relacionado; dor 1 relacionado	dor 2 relacionada; edema 2 relacionado; celulite de face 1 relacionada	astenia 3 possivelmente relacionada; sinusite 2 possivelmente relacionada; dor 4 provavelmente relacionada	NEGATIVO	NEGATIVO	105 dias	Progressão agressiva e sangramento e choque hipovolêmico
8	dor 3 relacionada; edema 2 relacionado	dor 4 provavelmente relacionada; edema 4 possivelmente relacionada; celulite de face grau 2 possivelmente relacionada		NEGATIVO	ÓBITO	38 dias	Linfangite carcinomatosa pulmonar e insuficiência respiratória aguda
9	celulite 1 provavelmente relacionada; dor 3 relacionada	sinusite aguda 2 possivelmente relacionada; dor 3 relacionada; edema de língua 2 até grau 3 relacionado	edema língua 3 até grau 4 relacionado; sinusite 2 possivelmente relacionada; astenia 3 possivelmente relacionada	PPD - Candidina - Tricofitina 30 mm	NEGATIVO	69 dias	Progressão agressiva e sangramento e choque hipovolêmico
10	melhora do humor e dor		ganho de peso progressivamente, melhora do humor e dor	NEGATIVO	PPD 10 mm Candidina - Tricofitina -		Vivo (837 dias em 10/10/06)
11**	dor 2 relacionada; edema palpebral olho direito 1 relacionado	edema face 2 relacionado	edema 3 relacionado; dor 2 relacionada; No 103º dia após 1ª dose fez ecocardiograma de rotina derrame pericárdico - pericardite grau 3 possivelmente relacionado.**	NEGATIVO	NEGATIVO	228 dias	Progressão agressiva e sangramento e choque hipovolêmico
12	dor 1 relacionada			PPD 20mm Candidina - Tricofitina -	ÓBITO	22 dias	Complicações tardias da gastrostomia endoscópica com hemorragia digestiva alta e hipovolemia.

O paciente 11** não realizou ecocardiograma prévio a inclusão no protocolo e apenas o fez no 103º quando encontrou-se derrame pericárdico moderado a grave sem constrição, assintomático, foi tratado com corticosteróide na suspeita de pericardite viral ou autoimune. Nenhum exame laboratorial ou sinal clínico sugeria doença autoimune. O paciente evoluiu com melhora progressiva mantendo um derrame de mínima espessura sem constrição e sem apresentar qualquer outra evidência de autoimunidade até seu óbito 125 dias após o primeiro ecocardiograma. Como o paciente não tinha ecocardiograma prévio classificou-se este evento como pericardite grau 3 possivelmente relacionada, entretanto não desconsiderou-se causas mais freqüentes como hipoproteinemia grave (anemia associada a hipoalbuminemia) e pericardite viral.

Grupo C: dose = 400 µg

Tabela 5 – grupo C e distribuição por gênero, idade, localização do tumor, classificação TNM, estágio, volume tumoral; índice de massa corporal (IMC) e índice de Karnofsky

Paciente	Gênero	Idade	Localização do tumor	TNM	Estadio	Volume tumoral (ml)	Tratamento	IMC	Karnofsky (%)
13	M	64	Cavidade oral	T4N2AM0	IV A	70,49	RT/QT	17,21	90
14	M	54	Laringe	T4N0M0	IV	171,69	CIRURGIA/RT	27,30	80
15	M	64	Laringe	T3N3M0	IV B	78,78	CIRURGIA/RT	18,56	90
16	M	33	Orofaringe	T4N0M0	IV A	22,34	CIRURGIA/RT/Q	20,73	80
17	M	66	Seio piriforme	T4N0M0	IV A	85,24	T CIRURGIA/RT/Q	19,62	80
18	M	63	Orofaringe	T3N3M0	IV B	8,07	CIRURGIA/RT	15	90
19	M	49	Orofaringe	T3N2M0	IV	96,23	CIRURGIA/RT	20	70
20	M	67	Cavidade Oral	T2N2M0	IV	81,88	CIRURGIA/RT	14,2	90
21	M	50	Laringe	T2N3M0	IV B	13,23	RT/QT	16,26	90

Tabela 6 – grupo C e caracterização quanto à ocorrência de eventos adversos com sua respectiva graduação e causalidade ; testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (TCT) pré e pós inclusão; intervalo entre a 1ª dose e óbito e causa mortis

Paciente	EA 1ª dose/ grau/ causalidade	EA 2ª dose/ grau/ causalidade	EA 3ª dose/ grau/ causalidade	TCT pré	TCT pós	Tempo óbito (após 1ª dose)	Causa mortis
13	edema 1 relacionado; broncopneumonia 3 possivelmente relacionada	erisipela de face grau 2 possivelmente relacionada; periodontite grau 3 possivelmente relacionada	diversas infecções oral/face 2 possivelmente relacionada; edema 2/3 possivelmente relacionado	NEGATIVO	NEGATIVO	186 dias	Progressão da doença e caquexia tumoral.
14	nega			NEGATIVO	ÓBITO	49 dias	Progressão da doença e falência de múltiplos órgãos (7º dia após 2ª dose internado por insuficiência respiratória aguda, por rolha de secreção traqueal, submetido a entubação orotraqueal e ventilação mecânica).
15	astenia 1 relacionado; dor 2 relacionada.			PPD 15 mm Candidina - Tricofitina -	ÓBITO	41 dias	Progressão da doença e sangramento tumoral com choque hipovolêmico (6º dia após 2ª dose sangramento tumoral abundante, sem controle com hemostasia cirúrgica e transfusões).
16	dor 2 relacionada; aumento progressivo para grau 3 relacionada.	dor grau 2 relacionada	dor 2/3 relacionada; sinusite aguda 1 possivelmente relacionada; cefaléia e dor na mandíbula 4 possivelmente relacionada; astenia 2 possivelmente relacionada.	NEGATIVO	NEGATIVO	181 dias	Progressão da doença e caquexia tumoral.

17	broncopneumonia 3 possivelmente relacionada			PPD 10 mm Candidina- Tricofitina-	ÓBITO	21 dias	Progressão da doença e sangramento tumoral com choque hipovolêmico e bronco-aspiração com insuficiência respiratória
18	melhora da dor após vacina; 5º dia dor 1 relacionada	nega	nega	NEGATIVO	NEGATIVO	171 dias	Progressão da doença e caquexia tumoral.
19	dor 3/4 e astenia 3 possivelmente relacionadas	dor 3/4 e astenia 3 possivelmente relacionadas	dor 3/4 e astenia 3/4 possivelmente relacionadas	NEGATIVO	NEGATIVO	100 dias	Progressão da doença e caquexia tumoral.
20	24 h após injeção dor 1 relacionada	edema local 1 relacionado 1 a 2 dias após injeção.	dor 2 relacionada	NEGATIVO	NEGATIVO	118 dias	Progressão da doença e caquexia tumoral.
21	linfonodomegalia retroauricular e dolorosa 1 relacionada (24-48 horas após injeção); dor 2 relacionada; 12º dia após iniciou com edema de língua 2 provavelmente relacionado com aumento progressivo até grau 4	inalterado	broncoinfecção 2 possivelmente relacionada; dor 3 e edema de face 3 relacionados.	PPD 18mm Candidina- Tricofitina -	NEGATIVO	127 dias	Progressão da doença e caquexia tumoral.

5. Discussão

5 DISCUSSÃO

Em diversas ocasiões as más condições clínicas do paciente, principalmente anemia grave e dificuldade de acesso venoso periférico para coleta bem como a recusa do paciente, foram motivos para suspensão de coletas previstas.

Existem poucos centros no mundo habilitados há desenvolver ensaios clínicos fase 1 principalmente com agentes biológicos. Para estes exige-se equipe multiprofissional especializada e capacitada a planejar o estudo; observar, registrar e tratar qualquer evento adverso possivelmente decorrente do tratamento em análise; discutir e classificar tais eventos. Estudam-se grupos de pacientes com doença avançada, sem outras opções terapêuticas curativas possíveis, e as infinitas limitações inerentes a esta. A motivação do paciente em participar de tais estudos é o benefício teórico potencial de um novo tratamento, apesar da análise de resposta a este não ser o foco de um ensaio clínico fase 1. Protocolos de uso de agentes biológicos em seres humanos devem atender às exigências de diversos órgãos reguladores, em última instância a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) no Brasil e o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos. Nestes ensaios é premissa básica que: “o bem-estar, a segurança e os direitos do paciente são considerados antes dos interesses da ciência e da sociedade, por mais que interfiram no cronograma previsto

pela pesquisa” (WHO, 2001). Todas estas particularidades tornam a realização de um ensaio clínico de fase 1 um grande desafio.

Os pacientes com CEC de cabeça e pescoço avançado apresentam depressão da resposta imune celular, estudos prévios têm focado principalmente na estimulação global da função imune utilizando estimulantes inespecíficos como BCG, *Corynebacterium parvum*, IL-2, IFN α e IFN γ (Luo, 1999). A estratégia de administração de DNA desnudo da HSP65 do *M.leprae*, originalmente utilizado em seres humanos nesta pesquisa, induz a célula tumoral a sintetizar e expressar esta proteína, quebrando também a tolerância aos antígenos tumorais, desencadeando resposta imune contra estes. Esta capacidade de contaminação da resposta imune celular (*epitope spreading*) contra antígenos tumorais observada por Lukacs em modelo animal maximiza o potencial de resposta anti-tumoral. (Lukacs, 1993).

A principal função de um estudo fase 1 é mapear a toxicidade de uma nova droga e neste ensaio a toxicidade relacionada significativa foi predominantemente local, menor que o tratamento padrão da doença avançada (radioterapia e quimioterapia).

Para avaliação de eventos relacionados ao tratamento é importante a determinação do estado em que se encontravam os pacientes antes do tratamento e como seria a evolução natural da doença. No tocante à dor, um bom parâmetro para avaliação é a quantidade e o tipo de analgesia utilizada pelos pacientes. No início do estudo todos os pacientes apresentavam dor. Em uma paciente não eram utilizados analgésicos potentes, nos outros 20

sim. Os pacientes que apresentaram progressão da doença apresentaram piora significativa da dor, o que pode ser observado nos resultados. Os quatro pacientes que apresentaram diminuição da lesão evoluíram com melhora da dor e diminuição do uso de analgésicos. A dor parece estar ligada à progressão tumoral uma vez que sempre que se evidenciou aumento do tumor ele veio acompanhado de dor. Nas primeiras 48 horas após a punção observamos sinais inflamatórios locais e dor local em todos os pacientes, porém com diminuição após este período.

Com a aplicação da vacina observamos uma resposta local e regional, com exuberante resposta inflamatória em alguns pacientes inclusive com o aparecimento de linfonodomegalias claramente reacionais bem evidentes nos pacientes 1 e 21. O paciente 1 apresentou clara diminuição tumoral e aumento da sobrevida atingindo 388 dias; para ele foi indicada manutenção do tratamento pela observação de melhora com este e piora após sua suspensão.

Os eventos adversos observados foram principalmente decorrentes desta inflamação tumoral, como aumento da dor local, edema, pequenos sangramentos e piora da astenia. Porém estes eventos observados também podem ser devido a destruição tumoral a resposta ao estímulo imunológico decorrente da aplicação da vacina. Seriam eles então efeitos de toxicidade indesejada ou resposta adequada ao estímulo vacinal? De qualquer forma foi importante a observação que nenhum paciente apresentou toxicidade significativa incapacitante ao uso da medicação.

No segundo grupo muitos pacientes que apresentaram eventos adversos graus 3 e 4, também tiveram rápida progressão da doença caracterizada no seguimento clínico e confirmada na segunda tomografia (quando esta foi realizada) entretanto o grupo optou por escalonar a dose para baixo conforme norma do CTCAE. Pelas características do CEC de cabeça e pescoço a dor e o edema local são conseqüências esperadas com a progressão tumoral. Este fato ficou ainda mais evidente com acompanhamento dos pacientes, e comparação da sua evolução com resultados de necropsia. Nos pacientes em que foi realizada, a necropsia demonstrou progressão agressiva da neoplasia, inclusive em um dos casos com carcinomatose pulmonar.

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

Os pacientes que finalizaram o protocolo apresentaram uma taxa de resposta (38,4%) maior do que a observada na literatura 15 a 30% em pacientes portadores de CEC avançado recidivado e submetidos a quimioterapia (Hong, 1983 e Al Sarraf, 1988). Uma comparação mais efetiva com outras séries é difícil porque a maioria dos estudos sobre pacientes com recidivas avançadas de CEC de cabeça e pescoço incluem pacientes portadores de doença metastática mas sem doença local, o que não é idealmente comparável com o grupo estudado, de recidivas locorregionais. Outros estudos incluem os pacientes com lesões recidivadas passíveis de

tratamento cirúrgico e ou radioterápico, que tem resultados melhores que os pacientes somente passíveis de tratar-se paliativamente. Como exemplo podemos citar o trabalho realizado no Hospital AC. Camargo, onde pacientes portadores de lesões N3 foram tratados com cirurgia, radioterapia e cuidados paliativos conforme a possibilidade. Os pacientes que receberam apenas cuidados paliativos apresentaram índice de sobrevida a 1 ano de 15,9%. Forestiere e Jacobs observaram sobrevida de 6 meses em pacientes submetidos a quimioterapia paliativa. Quando foram associados Cisplatina e Docetaxel houve uma melhora na sobrevida, de 6,5 a 9,6 meses (Schoffski, 1999; Specht, 1999 e Glisson, 2002).

A sobrevida dos nossos pacientes variou de 21 a 389 dias sem contar os dois pacientes que estão vivos, com sobrevida superior a 800 dias (tabela 7). Porém estes dados referem-se à sobrevida após a aplicação da primeira dose da vacina. Como o tempo médio entre as recidivas foi de 4 meses, os pacientes pertencentes ao protocolo tiveram a sua sobrevida ampliada. A questão que fica é se a melhoria nos cuidados devido ao seguimento individualizado característica de um protocolo de estudo fase 1, pode ser responsável por esta melhora na sobrevida ou se os pacientes tiveram benefício com o tratamento.

A existência de 4 pacientes que tiveram mais de um ano de seguimento após a primeira dose indica que houve sim um impacto na evolução dos tumores recidivados destes pacientes. A comparação entre a sobrevida destes 4 pacientes com os 9 que apresentaram progressão tumoral mostrou sobrevida estatisticamente superior. Cabe dizer que este

não é o objetivo do estudo e portanto os números não são suficientes para que possamos tirar nenhuma conclusão sobre sobrevida.

Encontraram-se principalmente eventos adversos decorrentes da inflamação tumoral, isto é aumento da dor local, edema, pequenos sangramentos e piora da astenia. Por esta razão indaga-se o quanto a toxicidade decorrente da vacina, representada pelo aumento da inflamação local, não está correlacionada diretamente com a resposta de destruição tumoral.

Como nos pacientes 4 e 10 ocorreu positividade do PPD após o esquema de vacinação , e estes tiveram redução do volume tumoral , pode-se inferir que a resposta antitumoral acompanhou a perda da anergia à HSP65 homóloga presente no extrato do PPD. Outro dado que corrobora para esta hipótese é que 4 pacientes (números 12, 15, 17 e 21) que tinham PPD maior ou igual a 10 mm prévio e sem evidência de tuberculose ativa apresentaram inflamação tumoral exuberante após receberem a vacina.

Também observou-se aumento do número de infecções no sítio tumoral e ao seu redor e infecções pulmonares possivelmente relacionadas ao procedimento de aplicação da vacina.

A análise do caso em que se encontrou derrame pericárdico não constrictivo assintomático não foi conclusiva quanto à definição de um evento autoimune, pois não se verificou auto-anticorpos na circulação e nem outro sinal ou sintoma que sugerisse síndrome autoimune até o óbito do paciente (125 dias após diagnóstico deste evento). Além do fato do paciente apresentar anemia grave e hipoalbuminemia, causas possíveis de derrame

pericárdico. Entretanto classificou-se como possivelmente relacionado, porque não existia ecocardiograma prévio e para maior atenção em ensaio futuro.

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

A pergunta central deste estudo não é a verificação de resposta ao tratamento, entretanto esta foi avaliada em estudo paralelo e encontrou-se regressão do volume tumoral em cinco pacientes. No primeiro paciente houve redução tumoral após as 3 doses da vacina e alguns meses após observou-se crescimento da massa tumoral, o que motivou o uso compassional da vacina. Este fato sinaliza o desafio atual na terapia biológica do câncer. Nesta o objetivo é a geração e manutenção de uma resposta de linfócitos T específicos antitumoral estabelecendo uma memória imunológica duradoura. Entretanto sabe-se que a vacina é aplicada num paciente cuja homeostasia do sistema imune está comprometida. Desta forma, a menos que estes linfócitos T anti-tumorais sejam protegidos dos mecanismos de preservação do tumor, eles também serão eliminados. Para superar este desafio uma vacina anti-tumoral deverá: ser administrada como adjuvante preferencialmente após a cirurgia ou após cirurgia associada a radiação ou quimioterapia e administrada em combinação com citocinas

“protetoras” com o intuito de prolongar a sobrevivência da resposta imune induzida pela vacina. (Whiteside, 2005).

Quanto ao futuro, ficam abertas as portas para a realização de ensaios em pacientes em condições clínicas e imunológicas mais preservadas, quem sabe em pacientes que apresentem doença em estágio mais precoce. Poderíamos então avaliar de forma mais precisa os efeitos da utilização da vacina de DNA HSP65 do *M. leprae* no combate ao CEC do trato aéreo-digestivo alto.

6. *Conclusões*

6 CONCLUSÕES

A vacina de DNA HSP65 do *Mycobacterium leprae* é segura para uso em pacientes com carcinoma epidermóide avançado do trato aéreo-digestivo alto refratário ao tratamento padrão,

Este estudo definiu como 3 aplicações de 400 µg a dose máxima tolerável desta vacina.

7. Anexos

Anexo A. Protocolo do Estudo

**SERVIÇO DE IMUNOLOGIA CLÍNICA E ALERGIA – HCFMUSP
SERVIÇO DE CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO – HCFMUSP
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA E VACINAS GÊNICAS – FMUSP/RP**

GRUPO DE IMUNO-ONCOLOGIA

**PROTOCOLO: “FASE 1 DO ESTUDO DA APLICAÇÃO DA VACINA DE DNA-HSP65 DO
Mycobacterium leprae EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE AVANÇADO
DE CABEÇA E PESCOÇO”**

GRUPO

PROTOCOLO DO PACIENTE

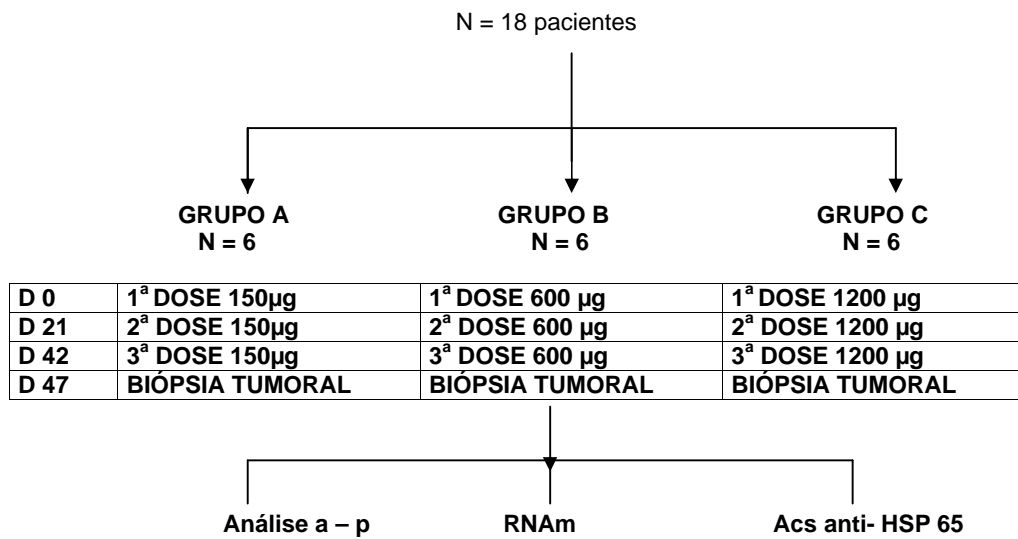


ÍNDICE

CHECK LIST
ESQUEMA DE ADMINISTRAÇÃO DA VACINA
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO
CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO
FICHA DA 1ª CONSULTA
FICHA DE ATENDIMENTO 1ª DOSE
ANEXOS:
 TABELA DE EXAMES
 KARNOFSKI
 TABELA DO CTC
 FICHA RECIST
 RELATO DE INTERCORRÊNCIAS
 RELATO DE EVENTOS ADVERSOS
 CONDUTA FRENTE AO EVENTO ADVERSO
FICHA DE ATENDIMENTO 2ª DOSE
ANEXOS:
 TABELA DE EXAMES
 KARNOFSKI
 TABELA DO CTC
 FICHA RECIST
 RELATO DE INTERCORRÊNCIAS
 RELATO DE EVENTOS ADVERSOS
 CONDUTA FRENTE AO EVENTO ADVERSO..
FICHA DE ATENDIMENTO 3ª DOSE
ANEXOS:
 TABELA DE EXAMES
 KARNOFSKI
 TABELA DO CTC
 FICHA RECIST
 RELATO DE INTERCORRÊNCIAS
 RELATO DE EVENTOS ADVERSOS
 CONDUTA FRENTE AO EVENTO ADVERSO
DESCRIÇÃO DA BIÓPSIA TUMORAL
ANÁLISE FINAL DOS EVENTOS ADVERSOS
ANÁLISE FINAL DO RECIST

CHECK LIST

DIA	DATA	ATIVIDADE	OK
		Identificar todas as páginas do protocolo do paciente	
		Consentimento pós-informe assinado	
		Preenchimento da ficha 1ª dose	
		Coleta de exames 1ª dose	
		Fotografia do tumor	
		CT pré-vacina	
0		1ª DOSE	
		CTC 1ª DOSE	
		RECIST 1ª DOSE	
		RELATÓRIO E.A. 1ª DOSE	
		Fotografia do tumor	
21		2ª DOSE	
		Preenchimento da ficha 2ª dose	
		Coleta de exames 2ª dose	
		CTC 2ª DOSE	
		RECIST 2ª DOSE	
		RELATÓRIO E.A. 2ª DOSE	
		Fotografia do tumor	
42		3ª DOSE	
		Preenchimento da ficha 2ª dose	
		Coleta de exames 2ª dose	
		CTC 2ª DOSE	
		RECIST 2ª DOSE	
		RELATÓRIO E.A. 2ª DOSE	
		Fotografia do tumor	
49		BIÓPSIA TUMORAL	
		COLETA FINAL DE EXAMES	
		ANÁLISE FINAL CTC	
		ANÁLISE FINAL RECIST	
		CT CONTROLE	

DESENHO EXPERIMENTAL:

→ avaliação clínica e laboratorial quanto a ocorrência de toxicidade, conforme preconizado pelo Common Toxicity Criteria – NIH;

→ avaliação da evolução do volume tumoral de acordo com RECIST;

→ DOSE MÁXIMA TOLERADA: dose inferior a que ocasionar toxicidade graus III a IV.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

	PACIENTE > 18 ANOS.
	CONSENTIMENTO IMFORMADO ASSINADO
	KARNOFSKI > 70%
	EXPECTATIVA DE VIDA > 3 MESES
	DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO
	DOENÇA SEM TERAPIA CURATIVA POSSÍVEL
	MASSA CERVICAL IRRESSECÁVEL
	AUSÊNCIA DE DOENÇA PULMONAR DEBILITANTE
	CREATININA < 2 mg/dl
	AUSÊNCIA DE DOENÇA SISTÊMICA GRAVE
	AUSÊNCIA DE DOENÇA AUTOIMUNE SISTÊMICA GRAVE
	AUSÊNCIA DE DOENÇA PSIQUIÁTRICA (exceto Depressão controlada)
	AUSÊNCIA DE NEUTROPENIA, PLAQUETOPENIA OU ANEMIA GRAVE
	TEMPO > 1 MÊS APÓS QT, e RT e CIRURGIA
	AUSÊNCIA DE INFECÇÕES SISTÊMICAS CONCOMITANTES
	AUSÊNCIA DE OUTRAS DOENÇAS MALÍGNAS (exceto CBC localizado)
	SEM TERAPIA BIOLÓGICA PRÉVIA
	EM MULHERES – EXCLUIR GRÁVIDAS, SE EM IDADE FÉRTIL DEVEM TER TESTE DE GRAVIDEZ NEGATIVO E USAR A.C.H.O.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

	LINFOPENIA
	USO DE CORTICOESTERÓIDES

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

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**1. NOME DO PACIENTE**

.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:

.....
BAIRRO: CIDADE

.....
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:

.....
BAIRRO: CIDADE:

.....
CEP: TELEFONE: DDD
(.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Fase 1 do estudo da aplicação da vacina de DNA-HSP65**

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

PESQUISADOR: Prof. Dr. Jorge Kalil

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52834

PESQUISADOR: Dr. Kald Abdallah

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 69793

PESQUISADOR: Dr. Pedro Michaluart Jr.

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 70236

UNIDADE DO HCFMUSP:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

	SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	X	RISCO
MÉDIO	RISCO BAIXO	RISCO MAIOR		

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dra Fanny Dantas de Lima

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

Dr Pedro Michaluart Jr.

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

Dr Kald Ali Abdallah

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

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal
pesquisador

assinatura do

(carimbo ou nome
Legível)

Fanny D. Lima

HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL:

.....

QUEIXAS ATUAIS:

APETITE:.....

DIETA: LÍQUIDA PASTOSA SÓLIDA

DISFAGIA ODINOFAGIA PALADAR: NORMAL ALTERADO

DISFUNÇÃO ANATÔMICA

DOR: SIM NÃO

NATUREZA.....

INTENSIDADE.....

FREQUÊNCIA.....

IRRADIAÇÃO.....

FATOR MELHORA.....

FATOR PIORA.....

ANOREXIA: SACIEDADE PRECOCE NÁUSEA PERDA PALADAR

PESO HABITUAL ANTES DA DOENÇA:.....kg ALTURA:.....m

EMAGRECIMENTO: SIM NÃO QUANTO:.....Kg/.....meses

OBSTIPAÇÃO: SIM NÃO TEMPO:.....meses

DIFICULDADE RESPIRATÓRIA: SIM NÃO TEMPO:.....meses

TRAQUEOSTOMIA: SIM NÃO DESDE QDO?...../...../.....

ALTERAÇÕES VISUAIS: SIM NÃO TEMPO:.....meses

DISFONIA: SIM NÃO TEMPO:.....meses

OBSTRUÇÃO NASAL: SIM NÃO TEMPO:.....meses

OTALGIA: SIM NÃO TEMPO:.....meses

RINORRÉIA: SIM NÃO TEMPO:.....meses

SANGRAMENTOS: SIM NÃO TEMPO:.....meses

TOSSE: SIM NÃO TEMPO:.....meses

SENSAÇÃO DE CORPO ESTRANHO: SIM NÃO TEMPO:.....meses

LOCAL:.....

FERIDAS: SIM NÃO TEMPO:.....meses LOCAL.....

LESÕES EXTERNAS: SIM NÃO TEMPO:.....meses

LOCAL.....

.....

.....

NÓDULOS OU MASSAS: SIM NÃO TEMPO:.....meses

LOCAL.....

.....

OUTRAS QUEIXAS:

GERAL:.....

.....

SONO:.....

.....

CARDÍACO:.....

.....

GASTROINTESTINAL:.....

.....

GENITAL:.....

...

URINÁRIO:.....

..

NEURO:.....

..

ANTECEDENTES PESSOAIS:

® ETILISMO:

O Sr já ingeriu bebidas alcoólicas pelo menos 1 vez por mês?

SIM, ainda bebe Nunca Só no passado

* Se parou nos últimos 12 meses a resposta é SIM.

Quando o Sr. Costuma beber ou bebia?

nas refeições entre as refeições ambos

Descreva os períodos de sua vida em que tomou bebidas alcoólicas:

(Vinho , cerveja ou destilados)

BEBIDA	IDADE DE INÍCIO	DE IDADE QUE PAROU	UNIDADE OU VOLUME	UNIDADES CONSUMIDAS	POR DIA/SEM/MÊS

® TABAGISMO:

O Sr fuma ou já fumou em média 1 cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, por pelo menos 1 ano?

SIM, ainda fuma Nunca Só no passado

*Se parou nos últimos 12 meses a resposta é SIM.

Descreva os períodos de sua vida em que fumou:

TIPO DE TABACO	IDADE DE INÍCIO	DE IDADE QUE PAROU	UNIDADE	UNIDADES CONSUMIDAS	POR	ANOS/MAÇO

HISTÓRIA PREGRESSA:

TRATAMENTO DA DOENÇA ATUAL:

CIRURGIA REALIZADA: SIM NÃO DATA:/...../.....

ESPECIFICAR:.....

.....

OUTRAS CIRURGIAS:.....

.....

RADIOTERAPIA: SIM NÃO INÍCIO:...../...../..... TÉRMINO:...../...../.....

DOSE.....cGy

QUIMIOTERAPIA: SIM NÃO

DROGA	DOSE	No DIAS	CICLOS	INÍCIO	FIM

SEGUNDA LESÃO:

LOCAL	SIM	NÃO	DATA	TRATAMENTO
CAVIDADE ORAL				
OROFARINGE				
HIPOFARINGE				
LARINGE				
ESÔFAGO				
PULMÃO				
OUTROS:				

RECIDIVAS:

LOCAL: SIM NÃO DATA:/...../.....

REGIONAL-CERVICAL: SIM NÃO DATA:/...../.....

NÍVEL:..... D E

NÍVEL:..... D E

NÍVEL:..... D E

TRATAMENTO DA RECIDIVA:

CIRURGIA REALIZADA: SIM NÃO DATA:/...../.....

ESPECIFICAR:.....

.....

RADIOTERAPIA: SIM NÃO INÍCIO:...../...../..... TÉRMINO:...../...../.....

DOSE.....cGy

QUIMIOTERAPIA: SIM NÃO

DROGA	DOSE	No DIAS	CICLOS	INÍCIO	FIM

METÁSTASES À DISTÂNCIA:

LOCAL	SIM	NÃO	DATA
SNC			
PULMÃO			
FÍGADO			
OSSOS			

OUTROS ÓRGÃOS:

.....

.....

DESCREVER TRATAMENTO DAS METÁSTASES:

LOCAL	CIRURGIA/ DATA	RT INÍCIO/FIM	QT INÍCIO/FIM

ALERGIAS:

.....

IMUNIZAÇÕES:

.....

DROGAS ILÍCITAS:

.....

HISTÓRIA FAMILIAR:

n° de irmãos:..... n° de irmãs:..... n° de filhos:..... n° de filhas:.....

HISTÓRIA DE CÂNCER:

FAMILIAR	VIVO/ MORTO	IDADE ATUAL ou DA MORTE	TUMOR	TIPO DE TUMOR	IDADE DO DIAGNÓSTICO	TABAGISTA

OUTRAS DOENÇAS:.....

.....

EXAME FÍSICO:

PAdeitado..... PA em pé..... P:..... FC:..... FR:.....

PESO:..... ALT:..... **IMC:**.....

GERAL:.....

....

TAMANHO DO TUMOR:cm Xcm Xcm

ASPECTO:.....

.....

LINFONODOS:

LOCAL	SIM	NÃO	N° LINFONODOS	> LINFONODO (cm)
NIVEL I D				
NIVEL II D				
NIVEL III D				
NIVEL IV D				
NIVEL V D				
NIVEL I E				
NIVEL II E				
NIVEL III E				
NIVEL IV E				
NIVEL V E				
NIVEL VI				
NIVEL VII				

METÁSTASES À DISTÂNCIA:

LOCAL	SIM	NÃO	DATA
SNC			
PULMÃO			
FÍGADO			
OSSOS			

OUTROS ÓRGÃOS:

.....

.....

TNM CLÍNICO: T.....N.....M.....

PELE:.....

.....

ORL:.....
.....
.....
TÓRAX:.....
.....
.....
ABDOME:.....
.....
.....
PERFUSÃO/PULSOS:.....
.....
.....
NEUROLÓGICO:.....
.....
.....
KARNOFSKI:.....

IMPRESSÃO DIAGNÓSTICA:

1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.

CONDUTA:

1. SOLICITAR:

HEMOGRAMA COAGULOGRAMA
Na, K, Cl, Mg, Ca, P, GASOMETRIA VENOSA
URÉIA, CREATININA
ELETROFORESE PROTEÍNAS
URINA 1
BTF, TGO, TGP, GGT, FA, DHL, CK
CT/F, TG
FERRITINA, TRANSFERRINA, SAT Fe
VHS, PCR, C3, C4, CH100, FAN, ANTI-DNA, ANTI-HSP65, ANTI-TPO, ANTI-TG, COOMBS
TIPAGEM ABO Rh
GLICEMIA, ÁC ÚRICO
T4 LIVRE, T3, T4, TSH
PPF 1 AMOSTRA
SOROLOGIAS: HIV, HCV, HBV, EBV, CMV, VDRL, FTAbs, CHAGAS, HSV
CD4, CD8
TCT
IGs
RX TÓRAX
ECG
ECOCARDIO
US ABDOME

OUTROS:.....
.....

2. ENCAMINHO À AVALIAÇÃO PSICOLÓGICA E NUTRICIONAL;

3. PRESCRIÇÃO:.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....

4. RETORNO:...../...../.....

OBSTIPAÇÃO: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 DIFICULDADE RESPIRATÓRIA: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 TRAQUEOSTOMIA: SIM NÃO DESDE QDO?...../...../.....
 ALTERAÇÕES VISUAIS: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 DISFONIA: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 OBSTRUÇÃO NASAL: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 OTALGIA: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 RINORRÉIA: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 SANGRAMENTOS: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 TOSSE: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 SENSAÇÃO DE CORPO ESTRANHO: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 LOCAL:.....
 FERIDAS: SIM NÃO TEMPO:.....meses LOCAL.....
 LESÕES EXTERNAS: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 LOCAL.....

NÓDULOS OU MASSAS: SIM NÃO TEMPO:.....meses
 LOCAL.....

OUTRAS QUEIXAS:
 GERAL:.....
 .
 SONO:.....
 .
 CARDÍACO:.....

 GASTROINTESTINAL:.....

 GENITAL:.....
 ...
 URINÁRIO:.....
 ..
 NEURO:.....

EXAME FÍSICO:

PAdeitado.....PA em pé.....P:..... FC:..... FR:.....
 PESO:.....ALT:.....IMC:.....
 GERAL:.....

TAMANHO DO TUMOR:cm Xcm Xcm
 ASPECTO:.....

LINFONODOS:

LOCAL	SIM	NÃO	Nº LINFONODOS	> LINFONODO (cm)
NIVEL I D				
NIVEL II D				
NIVEL III D				
NIVEL IV D				
NIVEL V D				
NIVEL I E				
NIVEL II E				
NIVEL III E				
NIVEL IV E				
NIVEL V E				

NIVEL VI				
NIVEL VII				

METÁSTASES À DISTÂNCIA:

LOCAL	SIM	NÃO	DATA
SNC			
PULMÃO			
FÍGADO			
OSSOS			

OUTROS ÓRGÃOS:

.....

.....
TNM CLÍNICO: T.....N.....M.....

PELE:.....

ORL:.....

.....
TÓRAX:.....

.....
ABDOME:.....

.....
PERFUSÃO/PULSOS:.....

.....
NEUROLÓGICO:.....

.....
KARNOFSKI:.....

AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA:**TIPO HISTOLÓGICO: CARCINOMA EPIDERMÓIDE**

VARIANTE MORFOLÓGICA: CLÁSSICO VERRUCOSO ADENOESCAMOSO

LINFOEPITELIAL ESCAMOSO BASALÓIDE ESCAMOSO ADENÓIDE

FUSOCELULAR OUTRO:.....

GRAU DE DIFERENCIAÇÃO:

BEM DIFERENCIADO MODERADAMENTE POUCO DIFERENCIADO

PROFUNDIDADE:

MICROINVASIVO LÂMINA PRÓPRIA PLANO MUSCULAR CARTILAGEM

OUTRAS

ESTRUTURAS:.....

INFILTRAÇÃO VASCULAR	SIM	NÃO	NÃO-AVALIÁVEL
SANGUÍNEA			
LINFÁTICA			
PERI-NEURAL			

INFILTRADO INFLAMATÓRIO PERI-TUMORAL:

AUSENTE ESCASSO MODERADO INTENSO

MARGENS CIRÚRGICAS (ESPECIFICAR):

COM DISPLASIA DE ALTO

GRAU:.....

ENVOLVIDA POR

TUMOR:.....

COM CARCINOMA IN

SITU:.....

NÃO AVALIÁVEL
LIVRES DE TUMOR

LESÕES EM ÓRGÃOS ADJACENTES:

.....
.....

LINFONODOS (descrever por Níveis , n° de comprometidos e presença de invasão extra-capsular):.....

.....
.....

DESCREVER LAUDO DA BIÓPSIA
(.../.../...)

.....
.....
.....
.....

*Anexar cópia do a-p.

ADMINISTRAÇÃO DA VACINA:

DATA: .../.../..... HORÁRIO:.....

RESPONSÁVEL:.....

DOSE:.....mcg n° DOSE: 1 2 3 n°FRASCO.....

DESCREVER TÉCNICA E LOCAL DE ADMINISTRAÇÃO:

DESCREVER INTERCORRÊNCIAS:

FICHA DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

(Descrição sumária dos parâmetros alterados conforme a tabela do CTAEC)

Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

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

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

1. NOME DO PACIENTE

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

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

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

PESQUISADOR: Prof. Dr. Jorge Kalil

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52834

PESQUISADOR: Dr. Kald Abdallah

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 69793

PESQUISADOR: Dr. Pedro Michaluart Jr.

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 70236

UNIDADE DO HCFMUSP:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	X	RISCO
MÉDIO	RISCO BAIXO		RISCO MAIOR

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dra Fanny Dantas de Lima

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

Dr Pedro Michaluart Jr.

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

Dr Kald Ali Abdallah

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

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal
pesquisador

assinatura do

(carimbo ou nome
Legível)

Fanny D. Lima

Anexo C. Índice de Karnofsky

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

Anexo D. RECIST

RECIST - *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Lesões passíveis de medição
- Pelo menos uma lesão com uma de suas dimensões > 20mm TC convencional ou > 10mm TC Helicoidal
- Primeira medida não pode ultrapassar 4 semanas antes do início do tratamento

CRITÉRIOS DE MEDIÇÃO:

- As medições tem de ser feitas com o mesmo método e a mesma técnica
- A medição de lesões clinicamente detectáveis (pele ou linfonodos) pode servir de parâmetro

MÉTODO DE MEDIÇÃO:

- CT ou RNM são os métodos de eleição
- USG só é aceito como parâmetro de resposta total
- Bx pode ser usada em caso de dúvida em casos de Resposta parcial e Resposta Total

DOCUMENTAÇÃO DAS LESÕES:

- Exames devem ser gravados bem como as maiores dimensões das lesões
- O parâmetro mais importante é a maior dimensão das lesões

TIPOS DE RESPOSTA:

- Resposta completa – Desaparecimento das lesões
- Resposta parcial – Diminuição de 30% ou mais da lesão
- Progressão da lesão – Aumento de 20% ou mais da lesão
- Lesão estável – Diminuição menor de 30% ou aumento menor de 20% da lesão

CONFIRMAÇÃO DE RESPOSTA:

- Deve ser feita medição em mais de uma oportunidade com pelo menos 4 semanas de intervalo
- Diferenciação entre lesão residual e fibrose deve ser feita com Bx

DURAÇÃO DE RESPOSTA:

- Tempo entre resposta parcial ou completa e a progressão de doença

TEMPO DE DOENÇA ESTÁVEL:

- Tempo entre a medição de doença estável e progressão da doença

REVISÃO DA RESPOSTA:

- Os resultados devem ser revisados por profissionais que não fazem parte do estudo

RESULTADOS- Divisão em grupos:

- Resposta completa
- Resposta parcial
- Doença estável
- Progressão de doença
- Óbito pela doença
- Óbito pelo tratamento
- Óbito por outras causas

8. Referências

8 REFERÊNCIAS

Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. **Cellular and molecular immunology**. 4th edition. Philadelphia: W.B.Saunders; 2000.

Abraham J e Allegra CJ. **Handbook of Clinical Oncology**. 2001. 1st Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Al Sarraf M. Head and neck cancer:chemoterapy concepts. **Semin Oncol**. 1988; 15:70-85.

Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B. DNA vaccination: Transfection and activation of Dendritic cells as key events for immunity. **J Exp Med**. 1999; 189(1):169-177.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, liu Y, Pulendran B, Palucka C. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev of Immunol**. 2000; 18:767-811.

Banchereau J, Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. 1998, 392: 245-252.

Bendani M, Gocke CD, Kobrin CB, *et al*. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against lymphoma. **Nature Medicine**. 1999; 5(10):1171-7.

Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0, DCTD, NCI, NIH, DHHS. March 31, 2003
Publish Date: August 9, 2006. Available from: <http://ctep.cancer.gov>.

Carvalho A.L., Treatment results on advanced neck metastasis from head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2005;132:862-8.

Cernea C, Montenegro F, Castro I, Cordeiro A, Gavotto L. Prognostic Significance of Lymph Node Reactivity in the Control of Pathologic Negative Node Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity. **Am J Surg.** 1997; 174:548-551.

Conley B A. Treatment of advanced head and neck cancer: what lessons have we learned? **J Clin Oncology.** 2006;24(7):1023-1025.

Faulds G, Conroy S, Madaio M, Isemberg D, Latchman. Increased levels of antibodies to heat shock proteins with increasing age in MRL/MP-LPR/LPR mice. **Brit J Rheumatol.** 1995; 34:610-615.

Forastiere A, Koch W, Totti A Sidransky D. Head and Neck Cancer. **N Engl J Med.** 2001;345:1890-1900

Geluk A, Elferink DG, Slierendregt BL, Meijgaarden KEV, Vries RRD, Ottenhoff TH, Bontrop RE. Evolutionary conservation of major histocompatibility complex-DR/peptide/T cell interactions in primates. **J Exp Med.** 1993;177:979-87.

Glisson BS, Murphy BA, Frenette G, Khuri FR, Forastiere AA Phase II trial of docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol.** 2002;20:1593-1599

Greten TF e Jaffee EM. Cancer Vaccines. **J Clin Oncol.** 1999;17(3):1047-60.

Hong WK, Bromer R. Chemoterapy in head and neck cancer. **N Engl J Med.** 1983; 308:75-79.

Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. **J Exp Med.** 1998; 188:2357-2368.

Igney FH e Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer.** 2002; 2:277-288.

Janeway CA, Travers M, Walport M et al. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença.** 6 ed. Artmed; 2007.

Kowalski LP. Results of salvage treatment of the neck in patients with oral cancer. **Arch Otolaringol Head Neck Surg.** 2002;128:58-62.

Lin EY, Nguyen AV, Russel RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. **J Exp Med.** 2001; 193:737-740.

Lotze MT, Thomson AW. **Dendritic Cells. Biology and clinical applications.** Academic Press, 1999.

Lowrie DB , Tascon RE , Bonato VLD , Lima VMF , Faccioli LH , Stavropoulos E , Colston MJ , Hewinson RG , Moelling K , Silva CL. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature.** 1999; 400: 269- 271.

Lukacs KV, Lowrie DB, Stokes RW, Colston MJ. Tumor cells transfected with a bacterial heat-shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors. **J Exp Med.** 1993 Jul 1;178(1):343-348.

Lukacs KV, Nakakes A, Atkins CJ, Lowrie DB, Colston MJ. In vivo gene therapy of malignant tumors with heat shock protein-65 . **Gene Ther.**1997 Apr;4(4):346-350.

Lucaks KV, Pardo OJ, Colston MJ, Geddes DM, Alton EFW. **Heat shock proteins in cancer therapy in Cancer Gene Therapy: Past Achievements**

and Future Challenges. 2000. Habib Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.

Luo Y, Chen X, Downs TM, O'Donnell MA. IFN-[alpha] 2B enhances Th1 cytokine responses in bladder cancer receiving *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. **J Immunol.** 1999; 162:2399-2405.

Pardoll DM. Inducing autoimmunity disease to treat cancer. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1999; 96:5340-2.

Revista Brasileira de Cancerologia.2001. 47(4):361-76. INCA - Ministério da Saúde.

Rosner, B. **Fundamentals of Biostatistics**, 4^a edição. New York: Duxbury Press;1994. pp. 682.

Rosemberg SA. **Biologic Theraphy of Cancer** 2000. 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Schoffski P, Catimel G, Planting A S,et al. Docetaxel and cisplatin: an active regimen in patients with advanced, recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. Results of a phase II study of the EORTC Early Clinical Studies Group. **Ann Oncol.** 1999;10:199-122.

Schuhbauer DMS, Mitchison NA, Mueller B. Interaction within clusters of dendritic cells and helper T cells during initial Th1/Th2 commitment. **European Journal of Immunology**. 2000; 30(5):1255-62.

Segal BH, Wang XY, Dennis CG, Youn R, Repasky EA, Manjili MH, Subjeck JR. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. **Drug Discovery Today**. 2006;11(11-12):534-40.

Specht L, Larsen SK, Hansen HS. Phase II study of docetaxel and cisplatin in patients with recurrent or disseminated squamous-cell carcinoma of the head and neck. **Ann Oncol**. 1999;11:845-849.

Sousa AO, Salem JI, Lee FK, Verçosa MC, Cruaud P, Bloom BR, Lagrange PH, David HL. Na epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1997; 94:13227-13232.

Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, Klinman DM. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. **J Immunol**. 2001 Oct 1;167(7):3555-8.

Therese P, Arbuch SG, Eisenhauer EA, Wanders J et al. New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. **Journal of the National Cancer Institute**. 2000; Vol. 92, No. 3: 205-216.

Toes REM, Ossendorf F, Offringa R, Melief CJM. CD4+ cells and their role in antitumor immune response. **J Exp Med**. 1999; 189:753-6.

Vermoken JB Medical treatment in head and neck cancer. **Annals oncol**. 2005;16:258-264.

White SA e Conry RM. Cancer Vaccines: Clinical applications (pg 679) in Rosenberg SA. **Biologic Therapy of Cancer**. 2000. 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Whiteside TL. Immune responses to malignancies. **J Allergy Clin Immunol**. 2003;111:S677-86.

Whiteside TL. Immunobiology of head and neck cancer. **Cancer and Metastasis reviews**. 2005; 24: 95-105.