

**ESTUDO SOBRE TERAPIA DE ABLAÇÃO POR
RADIOFREQUÊNCIA COMBINADO A INIBIDORES DE
CHECKPOINT DO SISTEMA IMUNE EM UM MODELO MURINO
DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS**

RAFAEL RIBEIRO MEDUNA

Dissertação apresentada a Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Walter Henriques Da Costa

Co-Orientador: Dr. Tiago Góss dos Santos

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

C493e Meduna, Rafael Ribeiro

Estudo sobre terapia de ablação por radiofrequência combinado a inibidores de *checkpoint* do sistema imune em um modelo murino de carcinoma de células renais. Rafael Ribeiro Meduna – São Paulo, 2021.

66p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Walter Henriques Da Costa

Descritores: 1. Carcinoma de Células Renais/Carcinoma, Renal Cell. 2. Sistema Imunitário/Immune System. 3. Ablação por Radiofrequência/Radiofrequency Ablation. 4. Camundongos/Mice.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco e Marina, meus grandes exemplos, por todo apoio, incentivo e suporte em todas as etapas da minha vida que resultaram em minha formação pessoal e profissional.

À minha esposa Harue, companheira e parceira de vida, agradeço todo o amor, apoio, incentivo e paciência em todos os nossos momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Walter Henriques da Costa, meu orientador, principal incentivador e idealizador deste projeto. Médico, cientista e ser humano, que sempre terei como modelo a ser seguido. Agradeço a toda ajuda e ensinamentos desde o nosso primeiro contato durante meu fellowship.

Ao Dr. Tiago Góss dos Santos, meu co-orientador, pelo intenso apoio desde o início do meu mestrado, e também idealizador deste projeto. Grande pesquisador e professor, durante todo este projeto me orientou, proporcionando um enorme aprendizado, sendo fundamental para este trabalho se concretizar.

À aluna de doutorado da Fundação Antônio Prudente Ariane Cavalcante dos Santos Sousa, que ajudou em todas as etapas deste projeto, dividindo seus conhecimentos e colaborando para superar as adversidades encontradas durante o processo.

À Dra. Stephania Martins Bezerra, sempre dedicada e disposta a colaborar foi fundamental durante o processo deste trabalho.

À Dra. Vilma Regina Martins, superintendente de pesquisa do Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center e chefe do grupo de biologia tumoral e biomarcadores, por todo apoio e suporte desde a concepção deste projeto.

Ao Prof. Dr. Stênio de Cassio Zequi, chefe do Centro de Referência em Tumores Urológicos do A.C.Camargo Cancer Center, profissional exemplar e ético. Grande incentivador em todas as áreas, sobretudo a pesquisa clínica, seu interesse e apoio no aprendizado contínuo, sem dúvida, contribuíram para minha escolha em realizar este trabalho.

Ao Dr. Kenneth Gollob e Dr. Chiang Tyang, por compartilhar seus conhecimentos e engrandecer este projeto, proporcionando sua realização.

Aos membros da banca de qualificação Dr. Rodrigo Sousa Madeira Campos e Dr. Luis Gustavo Morato de Toledo por contribuírem decisivamente para a qualidade do estudo.

À todos os alunos de mestrado e doutorado que desenvolvem seus projetos no Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center que me ajudaram durante este estudo.

À todos funcionários do Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, em especial ao técnico de biotério, Sr. Oraci Leite, que me ajudou e mostrou-se sempre disponível contribuindo nos experimentos com os camundongos.

À Sra. Daniele Caroline Lopes, representante da empresa Vita médica, por toda ajuda e disponibilidade para a realização dos procedimentos de radiofrequência.

Aos companheiros diários, Dr. Carlos Alberto Ricetto Sacomani, Dr. Éder Silveira Brazão Junior, Dr. Jayme Quirino Caon Nobre, Dr. Lucas Fornazieri, Dr. Mauricio Murce Rocha, Dr Rodrigo Sousa Madeira Campos, Dr. Stenio de Cássio Zequi, Dr. Thiago Borges Marques Santana, Dr. Victor Espinheira Santos, Dr. Walter Henriques da Costa, Dr. Wilson Bacheга Junior, pela amizade, ensinamentos e companheirismo.

À instituição A.C.Camargo Cancer Center pela possibilidade de aprendizado inestimável proporcionada pelos seus professores e, principalmente, seus pacientes.

À empresa Bristol Myers Squibb, que forneceu os medicamentos imunoterápicos para realização do estudo.

À empresa Vita Médica, que forneceu o material necessário para realização do procedimento de radiofrequência.

À Sra. Luciana Pitombeira da Pós-Graduação do A.C.Camargo Cancer Center pela ajuda e orientação.

À Sra. Suely Francisco, bibliotecária do apoio ao aluno no A.C.Camargo Cancer Center, pelo apoio e auxílio na normatização da tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro através do projeto Instituto Nacional para Ciência e Tecnologia em Oncogenômica e Inovação Terapêutica [INCiTO-INOTE (processo FAPESP - 2014/50943-1 e processo CNPq - 465682/2014-6)]

RESUMO

Meduna RR. **Estudo sobre terapia de ablação por radiofrequência combinado a inibidores de *checkpoint* do sistema imune em um modelo murino de carcinoma de células renais.** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente, 2021.

Introdução: O carcinoma de células renais (CCR) em estágios avançados apresenta prognóstico reservado, com 20% de sobrevida em cinco anos. O advento da imunoterapia baseada nos inibidores de *checkpoint* (IC) tem mostrado resultados promissores em ensaios clínicos com pacientes portadores de tumores renais metastáticos. Apesar dos resultados animadores, ainda se busca melhorar as taxas de resposta terapêutica. Para tanto, muitas estratégias têm sido estudadas no intuito de sensibilizar tumores menos imunogênicos e entre elas encontra-se a ablação por radiofrequência (RF). **Objetivo:** O intuito do estudo é avaliar em modelo murino o impacto da ablação térmica do tumor de linhagem RENCA e seu potencial de influenciar a resposta imunológica do hospedeiro quando combinado a tratamento sistêmico imunoterápico. O racional do estudo consiste na potencialização da resposta imunológica devido a maior apresentação de antígenos tumorais após a lesão tecidual desencadeada pela RF. **Materiais e métodos:** 49 animais da linhagem Balb/c foram inoculados com a célula de tumor renal Renca em região de flanco direito. Quando os tumores atingiram volume alvo de 500mm³ os animais foram divididos em três grupos de acordo com o tratamento do tumor primário: controle (Grupo 1), RF associada a imunoterapia (Grupo 2); e monoterapia isolada com IC (Grupo 3). Os animais que foram tratados com sucesso nessa fase foram submetidos a reinoculação de células tumorais Renca em flanco esquerdo. A taxa de recorrência após a reintrodução das células tumorais em cada grupo foi então observada. **Resultados:** Após a reinoculação das células RENCA, a taxa de crescimento do tumor foi significativamente menor nos grupos 2 e 3 quando comparados ao grupo controle [0,0% vs. 0,0% vs. 73,3%, respectivamente ($p < 0,001$)]. Não houve diferença na formação de tumores secundários após reinoculação de células tumorais entre os grupos 2 e 3. **Conclusão:** Animais submetidos a imunoterapia associada a RF ou imunoterapia isolada se mostraram menos propensos a crescimento tumoral após reinoculação com células Renca, o que sugere potencialização na formação de memória imunológica do hospedeiro. Adicionalmente, quando comparados os grupos 2 e 3, não observamos impacto significativo da RF nas taxas de crescimento do tumor secundário.

Descritores: Carcinoma de Células Renais. Sistema Imunitário. Ablação por Radiofrequência. Camundongos

ABSTRACT

Meduna RR. [Study on radiofrequency ablation therapy combined with immune checkpoint inhibitors in a murine model of renal cell carcinoma] [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente, 2021.

Introduction: Renal cell carcinoma (RCC) in advanced stages has a poor prognosis, with a 20% survival rate over five years. The advent of immunotherapy based on checkpoint inhibitors (CI) has shown promising results in clinical trials with patients with metastatic kidney tumors. Despite encouraging results, efforts are still being made to improve therapeutic response rates. Therefore, many strategies have been studied in order to sensitize less immunogenic tumors and among them is radiofrequency (RF) ablation. **Objective:** The aim of the study is to evaluate in a murine model of renal adenocarcinoma (RENCA) the impact of RF ablation and its potential to influence immune response when combined with checkpoint inhibitors. The rationale of the study is to enhance immune response by increasing tumor antigens presentation after tissue damage triggered by RF. **Materials and methods:** 49 Balb/c mice were inoculated with the Renca renal tumor cells in the right flank region. When the tumors reached a target volume of 500 mm³, animals were divided into three groups according to the treatment of the primary tumor: control (Group 1), RF associated with immunotherapy (Group 2); and monotherapy with CI (Group 3). The animals that were successfully treated in this phase were reinoculated with Renca tumor cells on the left flank. The recurrence rate after the reintroduction of tumor cells in each group was observed. **Results:** After reinoculation of RENCA cells, the growth rate of the tumor was significantly lower in groups 2 and 3 when compared to the control group [0.0% vs. 0.0% vs. 73.3%, respectively ($p < 0.001$)]. There was no difference in the formation of secondary tumors after reinoculation of tumor cells between groups 2 and 3. **Conclusion:** Animals submitted to immunotherapy associated with RF or immunotherapy alone had less tumor growth after reinoculation with Renca cells, which suggests the formation of more effective immune memory. In addition, when comparing groups 2 and 3, we did not observe a significant impact of RF on secondary tumor growth rates.

Keywords: Carcinoma, Renal Cell. Immune System. Radiofrequency Ablation. Mice.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Incidência e mortalidade de CCR no mundo no ano de 2020.....	1
Figura 2	Sumário do estadiamento e taxas de sobrevivência em tumores renais	8
Figura 3	Evolução das terapias no arsenal de tratamento do CCR metastático.....	9
Figura 4	Recomendações para o tratamento de primeira linha de CCR tipo células claras metastático	12
Figura 5	Recomendações após o tratamento de primeira linha de CCR tipo células claras metastático	12
Figura 6	Fases da imunoeedição do câncer	15
Figura 7	Esquema gráfico das moléculas envolvidas na interação imunológica entre a célula tumoral e os linfócitos T	18
Figura 8	Interpretação imunológica do efeito abscopal	23
Figura 9	Fluxograma do desenho experimental	30
Figura 10	Perfil do crescimento tumoral da linhagem Renca nos camundongos do grupo 1P	33
Figura 11	Imagem do tumor renal em flanco do animal	33
Figura 12	Histologia do tumor subcutâneo em flanco direito de animal submetido a ressecção cirúrgica exclusiva	34

Figura 13	Perfil do crescimento tumoral da linhagem Renca nos camundongos do grupo 2P	35
Figura 14	Imagens representativas do procedimento de radioablação	36
Figura 15	Crescimento tumoral da linhagem Renca nos camundongos submetidos a RF no grupo 1R	37
Figura 16	Histologia do tumor subcutâneo em flanco direito de animal submetido a RF exclusiva	38
Figura 17	Evolução da lesão tumoral após RF	38
Figura 18	Crescimento tumoral individual de cada animal durante a primeira aplicação de células tumorais do grupo 1	39
Figura 19	Crescimento tumoral individual de cada animal durante a primeira aplicação de células tumorais do grupo 2	40
Figura 20	Crescimento tumoral individual de cada animal durante a primeira aplicação de células tumorais do grupo 3	40
Figura 21	Média do crescimento tumoral dos grupos 1, 2 e 3 durante a primeira aplicação de células tumorais	41
Figura 22	Velocidade de crescimento do tumor primário do grupo 1 e 2	42
Figura 23	Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida livre de tumor secundário comparando os grupos avaliados	43
Figura 24	Média do crescimento tumoral dos animais do grupo 1 após a primeira e segunda inoculações com células tumorais	44

Figura 25	Velocidade de crescimento do tumor durante primeira e segunda inoculação no grupo 1	44
Figura 26	Histologia do tumor subcutâneo em flanco esquerdo de animal submetido a ressecção cirúrgica exclusiva	45
Tabela 1	Tipos histológicos de carcinoma de células renais	3
Tabela 2	Classificação TNM	5
Tabela 3	Estratificação de Risco por Grupo Prognósticos	11
Tabela 4	Recidiva tumoral após tratamento primário e crescimento tumoral após segunda aplicação de células neoplásicas nos grupos de estudo ...	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCR	Complexo do receptor do linfócito B
CCR	Carcinoma de células renais
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimental Animal
CTLA-4	Antígeno associado ao linfócito T citotóxico 4
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IC	Inibidores de <i>checkpoint</i>
IMDC	<i>International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MSKCC	<i>Memorial Sloan-Kettering Cancer Center</i>
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD-1	Receptor de morte programado 1
PD-L1	Ligante do receptor de morte programado 1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RF	Radiofrequência
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
Th17	Linfócito T helper 17
Threg	Linfócito T reguladores
TNM	<i>Tumor-node-metastasis</i>
VEGF	Inibidores dos receptores do fator de crescimento endotelial vascular
VTP	Terapia fotodinâmica com alvo vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Revisão de literatura.....	1
1.1.1	Epidemiologia e fatores de risco	1
1.1.2	Aspectos clínicopatológicos.....	2
1.1.3	Tratamento	5
1.2	Neoplasia e o sistema imune.....	13
1.3	CCR e Imunologia	15
1.4	IC Imune Aplicado ao CCR.....	18
1.5	Efeito abscopal.....	21
1.6	Terapia Combinada: Ablação por RF e Moléculas Imunomoduladoras	24
1.7	Justificativa e Modelos Animais para estudo da Interação do Sistema Imune com Tumores	25
2	OBJETIVOS	27
3	METODOLOGIA	28
3.1	Animais	28
3.2	Células.....	28
3.3	Inoculação subcutânea e crescimento tumoral	28
3.4	Ablação por RF.....	29
3.5	Tratamento com anticorpos neutralizantes.....	29
3.6	Desenho experimental.....	29
3.7	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Ensaio para avaliar o perfil de crescimento tumoral da célula Renca.....	32
4.2	Padronização do protocolo de ablação por RF.....	35
4.3	Efeito das Terapias Individuais sobre o Crescimento Tumoral Primário.....	39
4.4	Efeito das Terapias Individuais sobre o Crescimento Tumoral Secundário e	

	Resposta de Memória Imunológica	42
5	DISCUSSÃO.....	46
6	CONCLUSÕES.....	50
7	REFERÊNCIAS.....	51

ANEXO

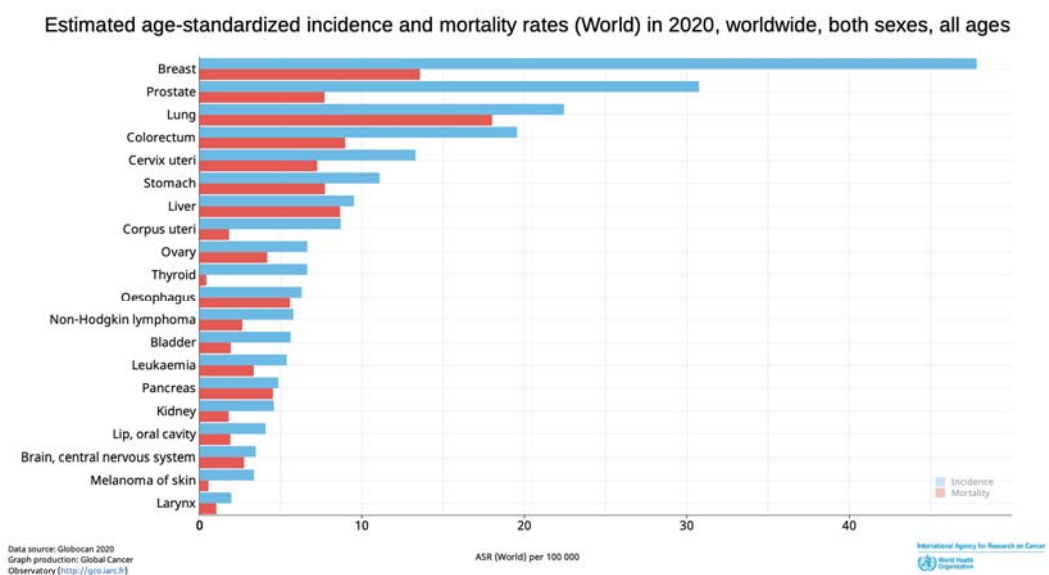
Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética do uso de Animais-CEUA

1 INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

O carcinoma de células renais (CCR) representa cerca de 3% de todos os cânceres, com a maior incidência ocorrendo nos países ocidentais ¹. Nas últimas duas décadas vem sendo observado um aumento gradual de cerca de 2% ao ano da incidência mundial da neoplasia renal ². Segundo dados da GLOBOCAN 2020 divulgados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), instituição afiliada à Organização Mundial da Saúde (OMS), a estimativa mundial da neoplasia renal no ano de 2020 foi de 431.288 casos novos e 179.368 mortes (Figura 1) ³. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) publicou a estimativa de 625 mil casos novos de câncer no país para cada ano do triênio 2020-2022. Contudo, esse documento não dispõe de informações sobre neoplasia renal ⁴. De acordo com o GLOBOCAN, estima-se uma incidência para o Brasil de aproximadamente 11971 pacientes diagnosticados em 2020, ocupando a 13ª posição entre os tipos de câncer mais frequentes, e aproximadamente 4753 mortes nesse mesmo ano, figurando na 17ª colocação em mortalidade ³.



Fonte: Globocan ⁵

Figura 1 - Incidência e mortalidade de CCR no mundo no ano de 2020

O CCR é lesão sólida mais comum do rim e é responsável por 90% de todas neoplasias renais ⁶. O CCR é um tumor primariamente do idoso com apresentação típica entre sexta e sétima década de vida, sendo a maioria acometida pela forma esporádica ⁷. Contudo, o CCR apresenta um componente hereditário em 5 a 8% dos casos podendo ocorrer em pacientes mais jovens ⁸. Existe uma predominância de 1,5:1 dos homens sobre as mulheres ^{1,7}. Até 30% dos pacientes apresentam doença metastática no diagnóstico e a recorrência se desenvolve em cerca de 40% dos pacientes com doença localizada tratados cirurgicamente ⁹. Pelo menos 5% dos pacientes com tumor primário pequeno, até 4 cm, inicialmente apresentam metástase e precisam de cirurgia citorrredutora e terapia sistêmica subsequente ¹⁰.

O principal fator de risco associado à predisposição ao CCR é o tabagismo ¹¹. O tabagismo isolado é responsável por até 19% dos casos ^{1,7}. Além disso, obesidade e hipertensão arterial crônica são identificados como fatores etiológicos principais na manifestação dessa doença ¹². Dessa maneira a profilaxia mais eficaz é evitar o tabagismo e reduzir a obesidade ^{1,12,13}. Uma série de outros fatores foram sugeridos como associados ao risco do CCR como uso de diuréticos e anti-hipertensivos, dieta pobre em vegetais e frutas, fatores hereditários, síndromes genéticas, doença cística renal adquirida, insuficiência renal crônica e esclerose tuberosa ^{7,12}.

1.1.2 Aspectos clinicopatológicos

Em relação aos subtipos histológicos o CCR é classificado em 80% dos casos como variante de células claras, 10% tipo papilífero 1 ou 2, 5% variante de células cromóforas, 1% carcinoma dos ductos coletores de Belini e outros com menor incidência ^{6,14}. A Tabela 1 apresenta os tipos histológicos de neoplasia renal segundo a classificação da OMS de 2016 ⁶.

Tabela 1 - Tipos histológicos de carcinoma de células renais

Células claras
Neoplasia renal cística multilocular com baixo potencial de malignidade
Papilífero
Carcinoma renal associado a leiomiomatose hereditária
Cromóforo
Ductos coletores
Medular
Carcinoma associado Translocação Família MiT
Carcinoma associado a deficiência succinato desidrogenase
Carcinoma tubular mucinoso
Carcinoma associado a doença cística adquirida
Carcinoma papilar de células claras
Adenoma papilar
Inclassificável

Fonte: Adaptado de Moch et al. ⁶

Atualmente a forma mais comum de apresentação clínica do CCR é a assintomática ¹⁵. O diagnóstico incidental ocorre em mais de 50% dos casos devido maior uso de exames de imagens para investigação de sintomas inespecíficos e outras doenças abdominais ^{15,16}. A tríade clássica composta por dor lombar, hematúria macroscópica e massa abdominal palpável é rara (6-10%), estando relacionada a uma histologia agressiva e doença avançada ^{17,18}. Síndromes paraneoplásica podem ser encontradas em até 30% dos pacientes com CCR sintomático, devido liberação de hormônios renais ou a produção de substâncias derivadas do tumor, sendo caracterizadas por anemia, hipertensão, disfunção hepática, caquexia, hipercalcemia, febre e policitemia ¹⁹. Alguns pacientes sintomáticos podem apresentar

sintomas causados por doença metastática como dor óssea, perda de peso, tosse persistente²⁰.

A avaliação do prognóstico de uma doença é de fundamental importância uma vez que vai orientar o tratamento²¹. O sistema de estadiamento formal mais antigo para neoplasia de células renais foi proposto por Flocks e Kadesky²² em 1958 e foi baseado em características anatômicas e observação dos padrões de disseminação tumoral. Robson et al.²³ posteriormente modificou o sistema adicionando o envolvimento vascular. Esse sistema foi amplamente utilizado principalmente nos primeiros estudos correlacionando o estadio do tumor com o prognóstico²⁴. Devido limitações, o sistema Robson viu sua utilidade clínica diminuir ao longo dos anos e foi amplamente substituído pelo sistema de estadiamento TNM de classificação dos tumores malignos²⁵. Esse sistema é baseado na extensão anatômica da doença (T), o grau de envolvimento dos linfonodos (N) e presença ou ausência de metástase a distância (M)²⁶. Avaliando esses parâmetros de maneira separada, é possível atingir uma classificação e prognóstico mais adequada²⁷. Associado a isso, o sistema *tumor-node-metastasis* (TNM) foi desenvolvido a partir de uma cooperação internacional e seu uso é adotado globalmente, facilitando a comparação de dados de diferentes populações e centros em todo o mundo²⁸. A última atualização, a oitava, ocorreu em 2017 (Tabela 2)²⁹.

Tabela 2 - Classificação TNM

Tumor primário (T)
T1: Tumor limitado ao rim, até 7,0 cm no maior diâmetro
T1a: Tumor até 4 cm, limitado ao rim
T1b: Tumor entre 4,1 e 7,0 cm, limitado ao rim
T2b: Tumor maior que 10,1 cm, limitado ao rim
T3: Tumor invade veias maiores ou dentro do tecido ao redor do rim, mas não invade glândula adrenal, limitado a fáscia de Gerota
T3a: Tumor invade veia renal, gordura perirrenal ou do seio renal, limitado à fáscia de Gerota
T3b: Tumor se estende à veia cava, abaixo do diafragma
T3c: Tumor se estende à veia cava, acima do diafragma ou invade sua parede
T4: Tumor se estende além da fáscia de Gerota, incluindo extensão por contiguidade da adrenal ipsilateral
Linfonodos regionais (N)
Nx: Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0: Ausência de metástases linfonodais regionais
N1: Presença de metástases em linfonodos regionais
Metástase à distância (M)
M0: Ausência de metástases
M1: Presença de metástases

Fonte: Adaptado de Paner et al. ²⁹

1.1.3 Tratamento

O tumor renal em estágios precoces é uma neoplasia altamente curável sendo a cirurgia a base do tratamento do CCR ³⁰. Embora a nefrectomia radical, descrita por Robson et al. em 1969, fosse o padrão de tratamento no passado, o aumento do uso da nefrectomia parcial se correlacionou com o aprimoramento das técnicas cirúrgicas, e o aumento da incidência de massas renais de pequeno volume (T1) devido à detecção mais precoce ^{23,31}. A nefrectomia parcial apresenta como principal vantagem a preservação de parênquima renal associada a menores taxas de insuficiência renal crônica, elevado controle tumoral local e resultados oncológicos comparáveis ao procedimento radical ³¹. A via de acesso da nefrectomia parcial ou nefrectomia radical pode ser aberta, vídeo-laparoscópica ou robô-assistida não influenciando no resultado oncológico ou taxa de complicações ³². Apesar disso, a via robótica na nefrectomia parcial apresenta uma taxa significativamente menor de conversão para cirurgia aberta e para cirurgia radical, menor tempo de isquemia quente,

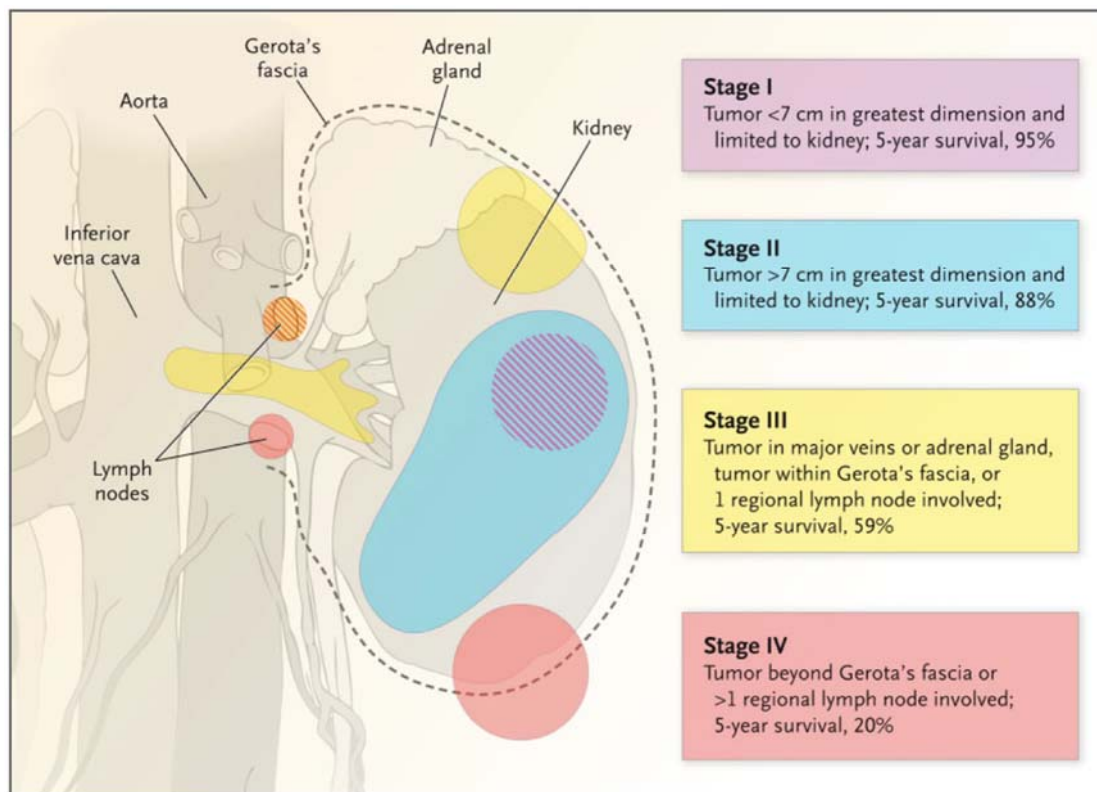
menor alteração na taxa de filtração glomerular estimada após a cirurgia e menor tempo de internação ³³. A literatura atual não indica a adrenalectomia de maneira rotineira, sendo reservado para casos onde existe suspeita ou confirmação pelos exames de imagem pré-operatórios ou suspeita durante o intra-operatório ³⁴. A indicação de dissecação linfonodal em conjunto com nefrectomia parcial ou nefrectomia radical ainda é controversa ³⁵. A suspeita de acometimento linfonodal ocorre através de exames de imagem, contudo apenas 20% é positivo no exame anátomo-patológico ³⁶.

A vigilância ativa pode ser uma opção terapêutica em casos de pequenas massas renais (tumores menores que 4cm) incidentais em pacientes idosos ou com comorbidades que impossibilitam a realização de um tratamento cirúrgico ^{37,38}. Essa abordagem é definida pelo acompanhamento do volume tumoral através de exames de imagem seriados, reservando a intervenção cirúrgica para tumores com progressão durante o seguimento ³⁹. Na maior série relatada avaliando vigilância ativa, foi demonstrado uma baixa taxa de crescimento dos tumores renais e a progressão para doença metastática ocorreu em uma pequena porcentagem dos pacientes ^{40,41}. Além disso, em até 20 a 30% das pequenas massas renais são tumores benignos quando biopsiados ou removidos cirurgicamente ⁴².

As técnicas ablativas, crioablação e radiofrequência (RF), são outras opções para o tratamento da neoplasia renal ^{43,44}. A RF é baseada na geração de calor para destruir as células tumorais ⁴⁴. Através de um gerador de RF e um eletrodo introduzido no tecido alvo é produzido uma corrente alternada de alta frequência gerando aquecimento do tecido e levando à destruição e desidratação das células cancerígenas ⁴⁵. A temperatura ideal de trabalho varia de 50 a 100 °C ^{44,45}. A crioablação é baseada na destruição e morte celular através da manutenção de temperatura constante de aproximadamente -40 °C através da inserção de probes na lesão renal utilizando o efeito *Joule-Thomson*, que é um processo em que gás (gás argônio) pressurizado pode sofrer rápida expansão através de um orifício restritivo resultando em uma enorme mudança de temperatura ⁴⁶. Essas técnicas representam uma alternativa segura para alguns grupos específicos de pacientes portadores de tumores renais: pequenas massas renais, idosos, comorbidades que limitem a abordagem cirúrgica, tumores renais bilaterais, pacientes com rim único ou síndromes familiares ⁴⁷. A literatura atual não dispõe de estudos prospectivos randomizados comparando as técnicas ablativas à ressecção cirúrgica ⁴⁸. Além disso, uma das principais desvantagens do método ablativo é o maior risco de recorrência local ^{49,50}.

Apesar do tratamento com intuito curativo, cerca de 30% dos pacientes podem apresentar recorrência da doença após tratamento primário ⁵¹. Contudo, até o presente momento não há evidências de estudos randomizados de fase III, de que terapia adjuvante oferece um benefício de sobrevida ⁵². Os esforços iniciais exploraram o tratamento adjuvante com quimioterapia, radioterapia, terapia com citocinas, tratamentos hormonais e vacinas de células tumorais, no entanto, produziram resultados desapontadores ⁵³⁻⁵⁷. Mais recentemente, a atenção foi dada para avaliação dos inibidores da tirosina quinase nesse cenário, pois eles melhoraram os resultados na doença metastática ⁵². Os estudos avaliaram o uso adjuvante de uma variedade de inibidores da tirosina quinase ⁵⁸⁻⁶³. Infelizmente, os resultados desses estudos foram conflitantes, permanecendo controverso o uso rotineiro na prática clínica ⁵². Atualmente, novas abordagens vem transformando o manejo de uma série de neoplasias malignas através da utilização de imunoterapias, particularmente com uso dos inibidores de checkpoint (IC) ⁶⁴. Nesse sentido, quatro estudos fase III estão avaliando a eficácia de uma série de IC em pacientes com CCR como tratamento adjuvante ⁶⁵. Os resultados são esperados nos próximos anos.

Apesar da maioria dos pacientes com CCR terem apresentação localizada, 25 a 40% desses pacientes tratados com intenção curativa vão desenvolver doença a distância ⁶⁶. Somado a isso, 20 a 25% dos pacientes vão se apresentar com doença metastática ao diagnóstico ⁶⁷. Após a ocorrência de metástases, torna-se uma doença com elevadas taxas de mortalidade (Figura 2) ⁶⁸. Nesse cenário, podemos utilizar como opções terapêuticas a nefrectomia citorrredutora, imunoterapia com IC e terapia alvo anti-angiogênica ⁶⁹.

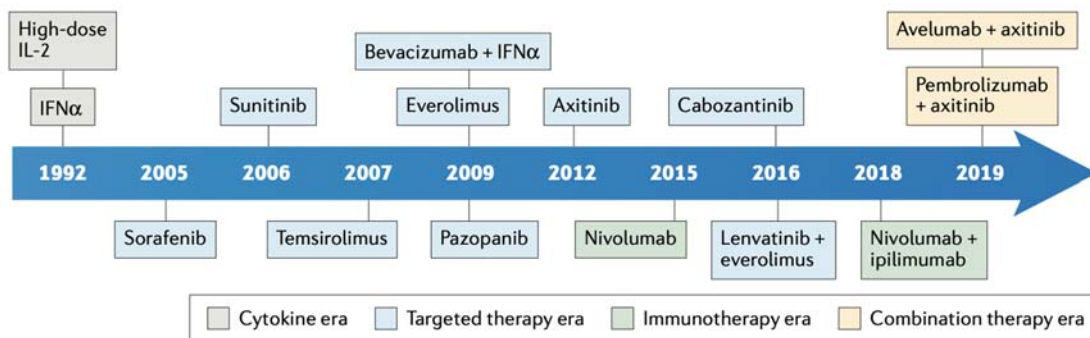


Fonte: Cohen e McGovern ⁷⁰

Figura 2 - Sumário do estadiamento e taxas de sobrevida em tumores renais

A quimioterapia não apresenta um papel importante no tratamento dos pacientes com doença metastática, podendo ser oferecida raramente ⁶⁶. Nas últimas décadas, grande avanço foi observado no tratamento do CCR metastático (Figura 3) ⁶⁴. Os primeiros agentes utilizados para o tratamento nesse cenário foram o interferon alfa e a interleucina-2, permanecendo como tratamento de eleição para o CCR metastático por muitos anos ⁷¹. Contudo, devido a baixas taxas de resposta associado a toxicidade elevada, houve a necessidade de investigar novos agentes capazes de potencializar a terapêutica do CCR metastático ⁷²⁻⁷⁴. A partir de meados dos anos 2000 houve a introdução de uma nova classe de fármacos, as terapias-alvo anti-angiogênicas [inibidores dos receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)] e inibidores da via de sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) ⁷¹. O sorafenibe foi a primeira droga aprovada, uma molécula inibidora de múltiplas quinases, em especial as relacionadas aos receptores do VEGF, do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) ^{75,76}. Além dele, outras medicações receberam aprovação, incluindo sunitibibe, axitinibe, cabozantinibe, levantinibe e pazopanibe que são da mesma classe de inibidores do

sorafenibe, além do anticorpo monoclonal bevacizumabe associado interferon alfa, e os inibidores de mTOR temsirolimus e everolimus ⁷⁷⁻⁸⁶. Isso resultou um impacto positivo na sobrevida global, embora as taxas de resposta completa objetiva dessas drogas girem em torno de 1-2% somente ⁸⁷. Devido a capacidade imunomoduladora do CCR associado ao desenvolvimento do conhecimento na terapia imunológica, foi possível o desenvolvimento de uma nova classe fármacos antineoplásicos, os IC imunológicos ⁸⁸. Estes novos medicamentos incluem inibidores do antígeno associado ao linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4, Ipilimumabe), do receptor de morte programado 1 (PD-1, Nivolumabe) e do ligante de PD1 (PD-L1, Pembrolizumabe, Avelumabe) ⁸⁹. Atualmente a utilização dos IC imunológicos é o tratamento padrão no paciente com CCR metastático ⁹⁰.



Fonte: Dizman et al. ⁹¹

Figura 3 - Evolução das terapias no arsenal de tratamento do CCR metastático

O tratamento dos pacientes no cenário metastático é guiado através de modelos de estratificação do risco da doença ⁹². Vários modelos de prognóstico foram desenvolvidos até o momento, mas os mais amplamente utilizados são os modelos do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC) e *International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium* (IMDC) ^{93,94}. Essas classificações fazem a estratificação de risco dos pacientes em grupos prognósticos: doença de risco favorável, intermediário e ruim (Tabela 3) ⁹²⁻⁹⁴. A associação de pembrolizumabe com axitinibe, pembrolizumabe com levantinibe e nivolumabe com cabozantinibe são tidos hoje como opções terapêuticas de primeira linha para a doença metastática em todos os grupos de risco IMDC, assim como associação entre nivolumabe e ipilimumabe nos grupos de risco intermediário e alto ^{90,95}. Pacientes que não podem tolerar ou receber os IC nesse cenário podem utilizar como tratamento alternativo sunitinibe, pazopanibe e cabozantinibe (Figuras 4 e 5) ⁹⁵.

Até pouco tempo atrás, a nefrectomia citorrredutora foi considerada o tratamento padrão nos pacientes com doença metastática ao diagnóstico ⁹⁶. Essa recomendação foi baseada em ensaios clínicos randomizados realizados durante a era das citocinas demonstrando que a nefrectomia citorrredutora associada a esse tipo de imunoterapia resultava em uma melhor sobrevida global dos pacientes ⁹⁷. Contudo, os melhores resultados com as terapias alvo e imunoterapias criaram um novo dilema em relação a iniciar o tratamento com terapia sistêmica ou cirurgia citorrredutora associado com terapia sistêmica ⁹⁶. Em geral a nefrectomia citorrredutora pode ser considerada antes de iniciar o tratamento sistêmico em pacientes com doença metastática de risco favorável ⁹⁸. No caso de pacientes de alto risco, a nefrectomia citorrredutora imediata não deve ser recomendada, sendo indicado iniciar terapia sistêmica ⁹⁹⁻¹⁰¹. Pacientes com risco intermediário que requerem terapia sistêmica não são beneficiados com a nefrectomia citorrredutora ⁹⁵. Apesar disso, pacientes de risco intermediário com apenas um fator de risco IMDC podem se beneficiar desta abordagem ¹⁰². A nefrectomia citorrredutora pode ser considerada em um segundo momento em pacientes de risco intermediário caso a resposta inicial a terapia sistêmica tenha bom resultado ⁹⁸. No caso de tumores primários sintomáticos (sangramento, obstrução da via urinária, dor refratária analgesia, hipertensão), a nefrectomia paliativa deve ser considerada independente do grupo de risco ¹⁰³.

Tabela 3 - Estratificação de Risco por Grupo Prognósticos

Critérios do <i>Memorial Sloan-Kettering Cancer Center</i> (MSKCC)
- Intervalo de tempo entre o diagnóstico e o tratamento menor que 1 ano
- Índice de desempenho (karnofsky) menor que 80%
- Cálcio sérico elevado (cálcio corrigido pela albumina acima do limite superior)
- Presença de anemia (hemoglobina abaixo do limite inferior)
- Desidrogenase láctica maior que 1,5 vez o limite superior
Critérios do <i>Internacional Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium</i> (IMDC)
- Intervalo de tempo entre o diagnóstico e o tratamento menor que 1 ano
- Índice de desempenho (karnofsky) menor que 80%
- Cálcio sérico elevado (cálcio corrigido pela albumina acima do limite superior)
- Presença de anemia (hemoglobina abaixo do limite inferior)
- Neutrofilia (neutrófilos acima do limite superior)
- Trombocitose (plaquetas acima do limite superior)
Grupos de Risco (MSKCC ou IMDC)
- Risco favorável: nenhum fator prognóstico adverso presente
- Risco Intermediário: um ou dois fatores prognósticos adversos presentes
- Risco Alto: três ou mais fatores prognósticos adversos presentes

Fonte: Adaptado de Heng et al. ⁹²

	Standard of Care	Alternative in patients who can not receive or tolerate immune checkpoint inhibitors
IMDC favourable risk	nivolumab/cabozantinib [1b] pembrolizumab/axitinib [1b] pembrolizumab/lenvatinib [1b]	sunitinib* [1b] pazopanib* [1b]
IMDC intermediate and poor risk	nivolumab/cabozantinib [1b] pembrolizumab/axitinib [1b] pembrolizumab/lenvatinib [1b] nivolumab/ipilimumab [1b]	cabozantinib* [2a] sunitinib*[1b] pazopanib* [1b]

Fonte: EAU guideline ⁹⁵

Figura 4 - Recomendações para o tratamento de primeira linha de CCR tipo células claras metastático

	Standard of care	Alternative
Prior IO	Any VEGF-targeted therapy that has not been used previously in combination with IO [4]	
Prior TKI	nivolumab [1b] cabozantinib [1b]	axitinib [2b]

Fonte: EAU guideline ⁹⁵

Figura 5 - Recomendações após o tratamento de primeira linha de CCR tipo células claras metastático

1.2 NEOPLASIA E O SISTEMA IMUNE

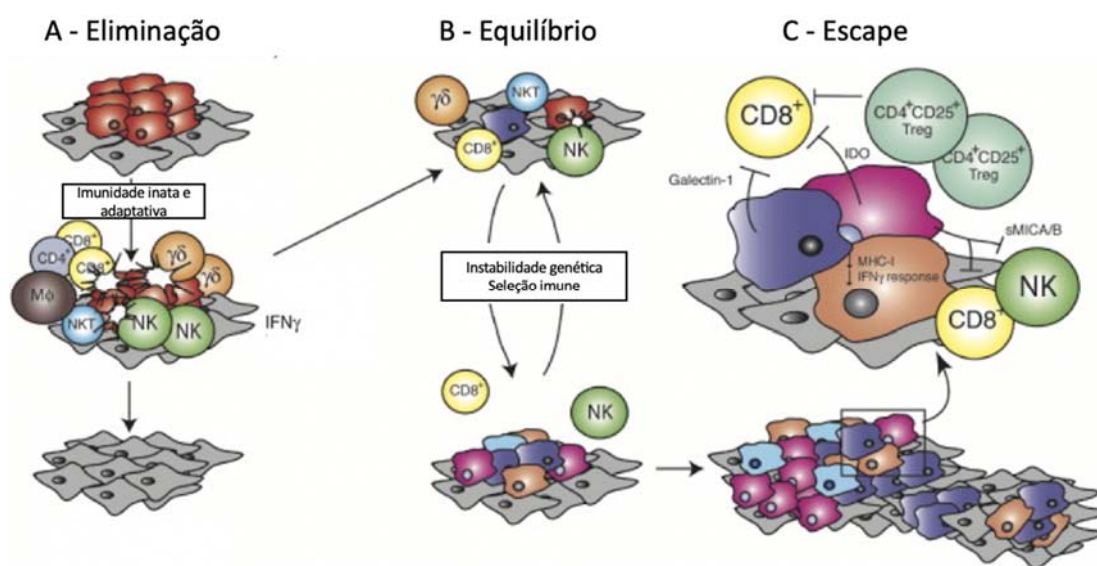
Em 1909, Paul Erlich desenvolveu a hipótese da uma interação entre o sistema imune e controle do crescimento de tumores ¹⁰⁴. Em 1957, Thomas e Burnet foram os primeiros a descrever a teoria de imunovigilância no câncer, que sugeriu que os linfócitos atuam como guardas responsáveis por identificar e eliminar células que sofreram mutações e diferem das células hospedeiras normais ¹⁰⁵. Essa área ganhou muito interesse nos últimos anos, e com desenvolvimento desse conceito, foi descoberto que o sistema imune não atua somente na eliminação das células tumorais, mas também pode agir selecionando tumores emergentes ^{104,106}. Esse conceito aprimorado da vigilância imunológica foi chamado de imunoeedição. Essa nova teoria é descrita ocorrendo em 3 fases: eliminação, equilíbrio e escape (Figura 6) ¹⁰⁷.

A primeira fase, de eliminação, corresponde à imunovigilância. Nessa fase, as células imunes exercem suas funções reconhecendo e erradicando as células tumorais ^{104,106}. Este mecanismo depende da interação entre sistema imune inato e adaptativo ¹⁰⁵. O início da resposta imune ocorre quando as células do sistema imune inato são alertadas para presença de um tumor em crescimento ¹⁰⁷. Independente do mecanismo de reconhecimento do sistema imune inato, a produção de interferon-gama ocorre nesses eventos, etapa importante para progressão da resposta antitumoral que resulta em morte de células tumorais. Essas células mortas são ingeridas por células dendríticas apresentadoras de antígenos tumorais que migram para linfonodo e apresentam o antígeno para células T CD4+ e T CD8+ provocando sua estimulação e proliferação ¹⁰⁴. Essas células, da imunidade adaptativa, são atraídas para o local da neoplasia onde reconhecem e destroem as células tumorais que expressam os antígenos específicos ¹⁰⁶. Quando esse processo de eliminação é incompleto pode-se avançar para fase de equilíbrio ¹⁰⁷.

A segunda fase representa um equilíbrio dinâmico, onde o sistema imune, atuando contra as células tumorais, tem capacidade suficiente para conter, contudo não de eliminá-las completamente ¹⁰⁸. Dessa forma, o sistema imune gera uma triagem de células tumorais instáveis e sujeitas a mutações ¹⁰⁸. O resultado disso é uma seleção darwiniana, produzindo uma seleção de células mais resistentes ao sistema imune e com uma reduzida imunogenicidade ¹⁰⁴. A fase de equilíbrio é provavelmente a mais longa das três fases podendo ocorrer ao longo de um período de muitos anos ¹⁰⁹. No momento que esses clones tumorais

resistentes conseguem crescer independente de uma resposta imunológica normal, atinge-se a fase de escape ¹⁰⁷.

A terceira fase (escape ou evasão) é caracterizada por uma violação das defesas imunológicas do hospedeiro ^{104,109}. Isso provavelmente ocorre quando as alterações genéticas e epigenéticas na célula tumoral conferem resistência a detecção ou eliminação pelo sistema imune, permitindo os tumores crescerem e se tornarem clinicamente detectáveis ¹⁰⁷. Os tumores podem impedir direta ou indiretamente o desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral através da elaboração de citocinas imunossupressoras (TGF- β ou interleucina-10) ou alterações a nível tumoral que afetam o reconhecimento do tumores pelo sistema imune (perda da expressão de antígenos, perda de componentes do MHC e desenvolvimento de insensibilidade interferon-gama) ou aumentam a resistência aos efetores da resposta imune citotóxica (expressão de sinais anti-apoptóticos) ^{107,108,110}.



Fonte: Adaptado de Strausberg ¹¹¹

Figura 6 - Fases da imunoeedição do câncer. (A) Fase eliminação: corresponde ao conceito de vigilância imunológica onde o sistema imunológico reconhece e destrói a célula neoplásica. (B) Fase de equilíbrio: as células imunes e tumorais sobreviventes entram num equilíbrio dinâmico. Este processo leva à seleção de células tumorais mais resistentes ao sistema imune e com uma reduzida imunogenicidade (C) Fase de escape: é caracterizada por uma violação das defesas imunológicas do hospedeiro

1.3 CCR E IMUNOLOGIA

No câncer, a imunogenicidade (capacidade de uma substância induzir uma resposta imune adaptativa) é determinada pelos antígenos tumorais, a extensão do infiltrado de células imunes e o tipo e a quantidade de moléculas imunomoduladoras presentes no microambiente tumoral ^{112,113}. O CCR é classificado como um tumor imunogênico baseado em parte nos benefícios clínicos observados após o tratamento sistêmico de pacientes com citocinas, interleucina-2 e interferon-alfa ¹¹⁴. A interleucina-2 tem papel na imunidade inata e adaptativa promovendo ativação de células natural killers e maturidade das células T CD8+ ¹¹⁵. Interferon-alfa tem atuação nas células T e células dendríticas para induzir seus efeitos antitumorais ^{109,116}. As taxas de resposta completa após esses tratamentos é cerca de 7% ¹¹⁷. Apesar de uma baixa resposta ao tratamento imunoterápico, isso sugeriu que uma pequena parte dos pacientes apresenta características imunológicas específicas e que ativação de componentes imunes antitumorais endógenos poderia ser uma estratégia terapêutica eficaz contra o CCR ^{117,118}.

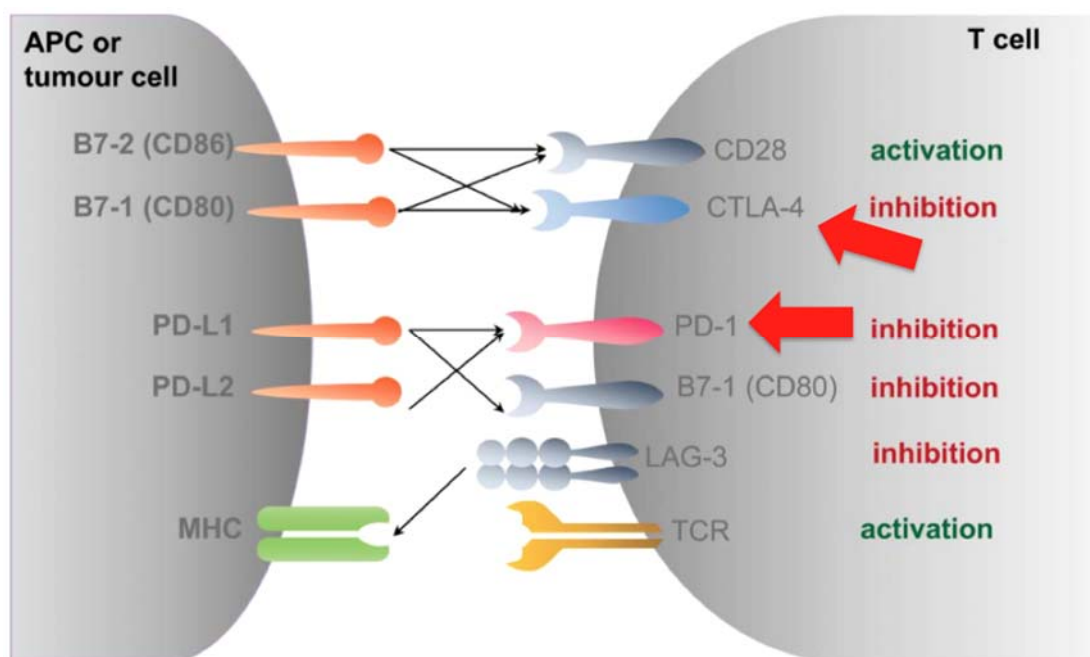
A neoplasia renal não é uma doença única ¹⁴. Essa neoplasia apresenta vários subtipos diferente de câncer caracterizados por diferentes fatores genéticos, cada um com sua própria histologia, curso clínico e resposta ao tratamento ⁷⁰. O CCR tipo células claras é o subtipo mais comum sendo responsável por mais de 70% dos tumores renais ^{14,70}. Esses tumores são caracterizados por ricos infiltrados de leucócitos, composto principalmente por células T CD8+, células T CD4+, células natural killers, como também células mielóides com características de macrófagos e neutrófilos ^{114,118,119}.

As células T são a principal população de células imunes no microambiente tumoral, com frequência média de 51% ¹²⁰. Apesar disso, nem todas essas células T apresentam atividade efetora, existem também células T com fenótipo imunossuprimido ¹¹⁸. Isso pode explicar o motivo de alguns tumores renais progredirem apesar de um infiltrado rico em células T ¹²⁰. Há evidência que melhores respostas antitumorais e maior sobrevida dos pacientes esta relacionada com uma maior proporção de linfócitos infiltrantes do tumor com atividade efetora e uma alta taxa de proliferação de células T CD8 + infiltrantes do tumor ^{114,119,121}. Por outro lado, pouco se sabe sobre o perfil imunológico e seu papel na progressão de tumores renais do tipo não células claras ¹¹⁸.

As células natural killers são linfócitos citotóxicos capazes de atacar células tumorais sem ativação prévia ¹²². Além disso, são reguladores imunológicos potentes, produzindo citocinas pró-inflamatórias e imunossupressoras ¹²³. Constituem cerca de 25% dos linfócitos do tecido renal saudável ¹¹⁸. No CCR foram associadas a um melhor prognóstico quando em concentrações mais altas ¹²⁴.

A população de células mielóides incluiu as células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, que são importantes para iniciar respostas imunes antitumorais e manter a homeostase imunológica ¹²⁵. No microambiente tumoral do CCR é descrito a presença de células dendríticas com um fenótipo imaturo, conhecido como tolerogênico ¹²⁶. Essas células levam a uma ativação insuficiente da imunidade antitumoral inata e adaptativa, representando um possível mecanismo de escape imunológico do CCR, associando um pior prognóstico nesses pacientes ¹¹⁸. Outro elemento importante do estroma tumoral são os macrófagos associados ao tumor ¹²⁷. Foi demonstrado que eles estimulam diretamente a proliferação de células tumorais e promovem a angiogênese ¹¹⁸. O aumento da densidade de macrófagos associados ao tumor está associado a uma sobrevida pior nos pacientes ¹²⁸.

Atualmente são conhecidos vários mecanismos que impedem a formação de uma resposta imune adequada ¹²⁹. O mecanismo que vem recebendo mais atenção nos últimos anos é a expressão de receptores-chave na superfície da célula T ¹³⁰. As células T tem sua ativação dependente de dois sinais ¹¹⁸. O primeiro envolve o reconhecimento de antígenos apresentado pelo MHC expresso nas células apresentadoras de antígenos pelo receptor de células T ¹³¹. O outro sinal envolve a interação da molécula co-estimuladora CD28 expressa em células T com o ligante B7 expresso nas células apresentadoras de antígenos ¹³². Esse processo é organizado por moléculas de checkpoint inibitório regulando a intensidade da resposta imune ¹³³. Entre essas moléculas destacam-se CTLA-4 e PD1 ^{131,132}. CTLA-4 é recrutado para membrana plasmática durante a fase de ativação das células T, apresentando uma alta afinidade para antígenos B7 ¹³⁴. Dessa maneira compete com o receptor co-estimulatório CD28 ¹³⁵. Quando a ligação entre CTLA-4 e B7 ocorre há uma sinalização inibitória resultando na diminuição da proliferação de células T e secreção de interleucina-2, impedindo a ativação de células T citotóxicas ^{134,135}. PD-1 é outro inibidor importante da ativação de células T ¹³⁶. Ele é expresso em células T efetoras ativadas, tendo como principal função nessas células limitar sua atividade nos órgãos linfoides primários durante o desenvolvimento da resposta imune inflamatória ¹³⁷. A ligação de PD1 com seu ligante na célula T (PDL1 e PDL2) inibe eventos de sinalização que promovem a ativação de linfócitos ¹³³. A Figura 7 ilustra o efeito dos IC na resposta imune e mostra como o seu bloqueio com o uso de anticorpos específicos para PD-1 (por exemplo o Nivolumabe) interrompe a sinalização negativa, restaurando a função antitumoral das células T ¹³⁸.



Fonte: McDermott et al. ¹³⁸

Figura 7 - Esquema gráfico das moléculas envolvidas na interação imunológica entre a célula tumoral e os linfócitos T

1.4 IC IMUNE APLICADO AO CCR

A descoberta e compreensão dos mecanismos pelos quais as moléculas de ponto de verificação imunológico diminuem a ativação das células T foi um grande avanço na imunologia do câncer ¹³⁹. Isso levou a avanços importantes no tratamento de alguns tipos de câncer, incluindo o CCR ¹⁴⁰. Por essa razão a imunoterapia ganhou muita atenção nos últimos anos tornando-se o principal tratamento no CCR avançado com a expansão das opções terapêuticas ¹⁴¹. O foco principal tem sido o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para CTLA-4 (ipilimumabe), PD1 (nivolumabe, pembrolizumabe) ou PDL1 (avelumabe, atezolizumabe), que tem como função bloquear essas moléculas com seus respectivos ligantes ¹⁴². Dessa maneira, restaurando as respostas imunes antitumorais ¹¹⁸.

O primeiro inibidor de checkpoint imune a ter um papel no tratamento do CCR metastático foi o nivolumabe. No ensaio fase III, CheckMate-025, pacientes que haviam recebido até duas terapias antiangiogênicas anteriormente foram randomizados para receber nivolumab ou everolimus. O nivolumabe melhorou a sobrevida global para 25 meses em comparação a 19,6 meses para o everolimus. Esse resultado levou à aprovação do nivolumabe

como monoterapia pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do CCR metastático após utilização de terapia antiangiogênica ¹⁴³. Mais recentemente, outro inibidor de checkpoint imune foi estudado em pacientes virgens de tratamento com CCR avançado no estudo de fase II Keynote-427. Resultados preliminares mostram que a monoterapia com pembrolizumabe resultou em uma resposta objetiva geral de 36% ¹⁴⁴.

Atualmente em pacientes com CCR tipo células claras metastático a associação entre pembrolizumabe mais axitinibe, nivolumab mais cabozantinibe e pembrolizumabe mais levatinibe são o padrão de tratamento de primeira linha para todos os grupos de risco IMDC e nivolumabe e ipilimumabe nos grupos de risco intermediários e alto do IMDC. Vários estudos demonstraram o benefício dessas associações sobre o uso da terapia alvo isolado ⁹⁵.

O estudo fase III CheckMate-214 foi conduzido randomizando pacientes com CCR metastáticos virgens de tratamento para receber a combinação nivolumabe e ipililumabe ou sunitinibe. Os pacientes foram estratificados por grupos de risco (definidos pelos critérios do IMDC): favorável, intermediário, alto. Pacientes com risco intermediário e alto apresentaram taxas de sobrevida geral (75% versus 60%), taxa de resposta objetiva (42% versus 27%) e taxa de resposta completa (9% versus 1%) significativamente maiores no braço da combinação de agentes imunoterápicos do que após tratamento com sunitinibe. Em pacientes de risco favorável não foi identificada diferença significativa entre os tratamentos ¹¹⁷. Recentemente foram publicadas análises atualizadas desse ensaio que continuam a demonstrar benefícios de eficácia duráveis ¹⁴⁵.

A terapia com agentes anti-VEGF tem sido componente integral do tratamento do CCR metastático por vários anos ¹⁴⁶. Cada vez mais, o VEGF é reconhecido como um dos múltiplos mecanismos inibitórios imunológicos que permitem o escape imunológico no cenário dos IC imune ¹⁴⁷. Isso sugeriu um possível benefício da combinação entre esses tratamentos, levando a uma série de ensaios clínicos e aprovações subsequentes de terapias combinadas ¹⁴⁸. Os principais resultados desses estudos serão apresentados a seguir: KEYNOTE-426, CheckMate 9ER, CLEAR, JAVELIN 101 e IMmotion 151 ⁹⁵.

O ensaio KEYNOTE-426 avaliou em pacientes com CCR metastático virgens de tratamento a combinação entre pembrolizumabe associado a axitinibe em comparação a sunitinibe. O estudo mostrou que a terapia combinada promoveu uma redução relativa de 47% no risco de morte. Além disso, a sobrevida livre de progressão mediana foi de 15,1 meses no grupo pembrolizumabe-axitinibe versus 11,1 meses no grupo sunitinibe. As taxas de

resposta objetiva também foram maiores no braço experimental (59,3% versus 35,7%)¹⁴⁹. Atualização recente desse trabalho mostrando manutenção dos benefícios e uma taxa de resposta completa para terapia combinada de 9% e de 3% para o braço sunitinibe¹⁵⁰.

O estudo fase 3 CheckMate 9ER avaliou nesse mesmo cenário randomizando pacientes para uso de nivolumabe mais cabozantinibe versus sunitinibe. Após um seguimento mediano de 18,1 meses, o regime de tratamento combinado foi associado a uma redução de 49% no risco de progressão de doença em comparação ao braço sunitinibe. Além disso reduziu o risco de morte em 40%, apresentou taxas de resposta objetiva (57,7% versus 27,1%) e taxas de resposta completa (8% versus 4,6%) maiores em comparação ao tratamento com sunitinibe¹⁵¹.

O estudo CLEAR comparou 3 esquemas de tratamentos contra o CCR metastático em pacientes virgens de tratamento: pembrolizumabe mais levantinibe, evorolimus mais levantinibe e sunitinibe. Os autores observaram que a combinação pembrolizumabe mais levantinibe apresentou melhores resultados do que a associação evorolimus mais levantinibe ou o uso isolado de sunitinibe alcançando sobrevida livre de progressão de 23,9 meses, 14,7 meses e 9,2 meses respectivamente. Além disso, a primeira combinação apresentou melhora significativa da sobrevida geral, taxas de resposta objetiva de 71% e taxas de resposta completa de 16%¹⁵².

Outro estudo avaliando essa combinação foi o ensaio clínico JAVELIN 101. A combinação avelumabe e axitinibe foi avaliada no tratamento de paciente com CCR avançado em comparação ao uso de sunitinibe. O tratamento com terapia combinada apresentou sobrevida livre de progressão mais longa em comparação a sunitinibe em pacientes com tumores PDL1 positivo (13,8 versus 7,2 meses) e na população geral do ensaio (13,8 contra 8,4 meses). Em pacientes com tumores PDL1 positivo, a taxa de resposta objetiva foi de 55,2% com avelumabe mais axitinibe e 25,5% com sunitinibe. Os dados para sobrevida geral ainda são imaturos^{153,154}.

Finalmente, o ensaio clínico IMmotion 151 avaliou pacientes com CCR metastático que foram randomizados para receber o tratamento com atezolizumabe mais bevacizumabe ou sunitinibe. A sobrevida livre de progressão foi mais longa com a terapia combinada em comparação com sunitinibe (11,2 versus 7,7 meses). A taxa de resposta objetiva foi de 43% para o grupo de combinação versus 35% no grupo de sunitinibe. Os dados para concluir um benefício em sobrevida geral ainda são imaturos¹⁵⁵.

Embora o CCR do subtipo células claras seja o mais comum, a OMS reconhece vários outros subtipos histológicos distintos, geralmente referidos como CCR não-células claras⁶. O tratamento dos pacientes com CCR não-células claras metastático é baseado no uso de sunitinibe e everolimus, com preferência para sunitinibe¹⁵⁶. Apesar disso, o tratamento com imunoterapia vem sendo avaliado nesse cenário com bons resultados. O estudo Keynote-427 que avaliou a monoterapia com pembrolizumabe incluiu uma coorte de 165 pacientes com CCR metastático não células claras. Esse estudo descreveu uma taxa de resposta objetiva de 24,8% e uma taxa de resposta completa de 4,8%. Contudo, esses resultados são baseados em um estudo de fase II de braço único¹⁵⁷. Além disso, a análise de subgrupos de alguns estudos mostrou bons resultados para o uso de IC imunológico, em combinação com agentes anti-VEGF ou isoladamente, em tumores renais com características sarcomatóide⁹⁵.

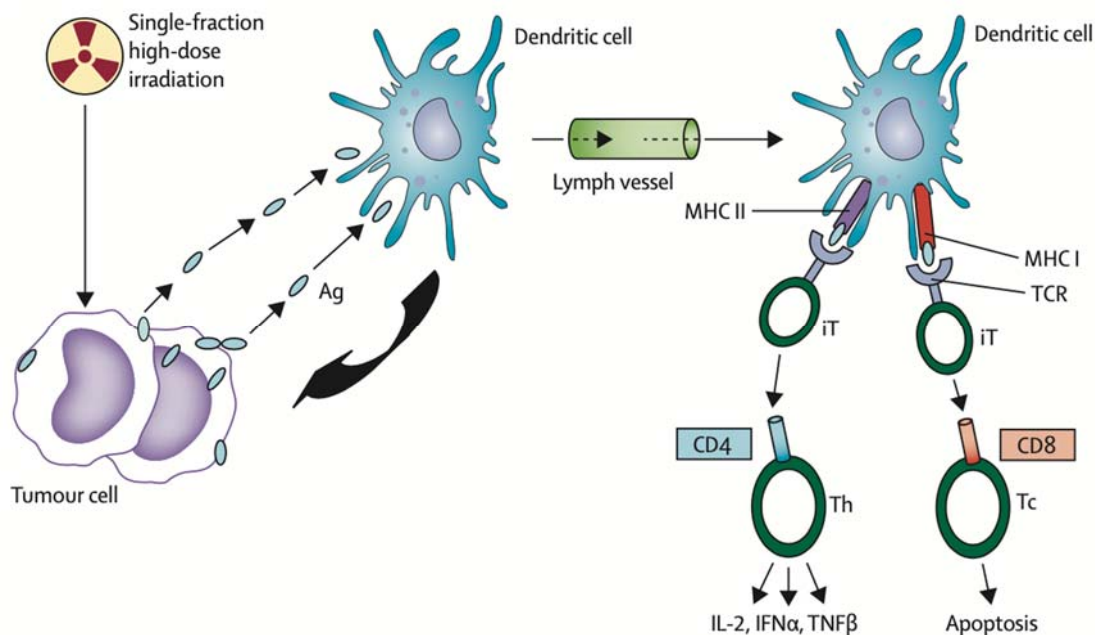
Conforme exposto, o tratamento baseado em IC mostrou resultados impressionantes no cenário metastático do CCR. Isso motivou a realização de vários estudos no cenário adjuvante com essas drogas. Estes estudos incluem os IC nivolumabe (estudo PROSPER), pembrolizumabe (estudo KEYNOTE-564), atezolizumabe (estudo IMmotion 010), durvalumabe (estudo RAMPART). O recrutamento para a maioria desses estudos ainda está em andamento e os resultados são esperados até 2022⁹⁵.

1.5 EFEITO ABSCOPAL

Conforme exposto, o papel da imunoterapia no tratamento do CCR metastático é central^{89,158}. Apesar dos resultados sensivelmente melhores quando comparados a terapia alvo anti-angiogênica, ainda existe espaço para melhora no tratamento desses pacientes¹⁵⁹. Estudos vem demonstrando que uma das vias de exacerbação do efeito da imunoterapia é o fenômeno conhecido como efeito abscopal¹⁶⁰. Abscopal é um termo latino, no qual “*ab*” significa longe e “*scopal*” significa alvo¹⁶¹. Trata-se, portanto do efeito que o tratamento do tumor primário desencadeia nos sítios tumorais distantes do que foi diretamente tratado¹⁶². A regressão das metástases após o tratamento local foi descrita em vários tipos de tumor, incluindo neuroblastoma, linfoma, melanoma e CCR, sendo particularmente observada em metástases pulmonares¹⁵⁹. Originalmente descrito em radioterapia, ele é raramente observado com o uso isolado da radioterapia¹⁶³. Isoladamente a resposta imune específica antitumoral desencadeado pela ablação *per se* é fraca e insuficiente para prevenir a

progressão de doença ^{164,165}. Porém, pode ser utilizada como estratégia de ressensibilização ou estimulação do sistema imune do paciente, nos casos que se convencionou denominar de “*cold tumors*”, ou seja, aqueles tumores com pouca capacidade de deflagrar uma resposta imune efetiva ¹⁶⁶. Recentemente, vários relatos de casos do efeito abscopal com radioterapia publicados na literatura foram em associação com IC imunológico, sugerindo que essa combinação pode ser o cenário onde o efeito abscopal ocorra em uma frequência maior ¹⁶⁷. O primeiro relato no cenário da imunoterapia foi publicado em um paciente com melanoma metastático que apresentava progressão tumoral durante uso de Ipilimumab ao irradiar um dos sítios metastáticos, entrou em remissão completa de todos os focos dois meses após ¹⁶².

Os mecanismos que explicam esse fenômeno são complexos e não são totalmente compreendidos, envolvendo uma série de etapas (Figura 8) ¹⁶⁸. O Efeito citotóxico da ablação do tumor primário libera antígenos tumorais ¹⁶⁹. Associado a isso, os efeitos imunomodulares desencadeados pela inflamação e apoptose recrutam células dendríticas para o local irradiado que reconhecem os antígenos tumorais e migram para os linfonodos, onde esses antígenos são apresentados para os linfócitos T CD4+ e CD8+ citotóxicos ¹⁶³. Dessa maneira, os linfócitos T CD8+ atuam através da imunidade mediada por células T, tanto no tumor que sofreu a ablação como no sítio metastático, após alcançarem a corrente sanguínea ¹⁷⁰. A utilização de IC pode ajudar a impulsionar o efeito abscopal, facilitando a ativação das células T ¹⁷¹.



Fonte: Meerleer et al. ¹⁶³

Figura 8 - Interpretação imunológica do efeito abscopal

Além de estudos avaliando o potencial do efeito abscopal da radioterapia, outras fontes de ablação também já foram avaliadas em uma série de neoplasias ¹⁷². A ablação térmica leva a liberação de vários fatores de modulação imunológica como antígenos tumorais, sinais de perigo e citocinas ¹⁷³. A destruição do tumor pela termoablação libera antígenos tumorais induzindo uma resposta imune com um maior influxo e maturação das células dendríticas ¹⁷⁴. Após a morte celular por necrose as células também secretam sinais de perigo ^{173,175}. Os sinais de perigo são moléculas endógenas, como proteínas de choque térmico e *groupbox-1* de alta morbidez, que estimulam uma maior captação e processamento de antígenos tumorais pelas células dendríticas, aumentam a expressão de MHC classe I na superfície das células tumorais, induzem a migração e maturação de células imunes e liberam citocinas e outros mediadores inflamatórios ^{172,173}. Além disso, após a ablação térmica ocorre a produção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e fator de necrose tumoral alfa, que também influenciam na resposta imune ^{172-174,176}.

Em 2010, Marin et al. ¹⁷⁷ avaliaram o efeito da crioblação isolada em modelo murino de CCR metastático. Linhagens celulares foram implantadas na cápsula renal e os animais foram submetidos a aplicação de probe de crioblação. Aqueles que receberam o tratamento ablativo apresentaram maior ativação imunológica do que os animais que não foram

submetidos à ablação. Posteriormente, um grupo da Holanda, avaliou a combinação entre RF e imunoterapia com Interleucina-2 em modelo murino de CCR metastático. Os autores descreveram que o grupo que utilizou a terapia combinada apresentou menor volume de doença metastática e maior número de linfócitos no tecido tumoral, sugerindo se tratar de um efeito abscopal no modelo experimental ¹⁷⁸.

No contexto clínico, existe um estudo avaliando o efeito da RF citorreduzora em 114 pacientes com CCR metastático recebendo Sunitinib ou Interferon como terapia sistêmica. Os autores descrevem que a realização da RF não influenciou as taxas de sobrevida estudadas, limitando sua utilização no contexto de terapia sistêmica baseada em inibidores de tirosina quinase. No grupo de pacientes tratados com Interferon, houve uma melhora marginal nas taxas de doença livre de progressão ¹⁷⁹.

1.6 TERAPIA COMBINADA: ABLAÇÃO POR RF E MOLÉCULAS IMUNOMODULADORAS

Conforme discutido anteriormente, a lise celular promovida por agentes físicos em massas tumorais (radiação ionizante, RF e agentes criogênicos) é capaz de desencadear respostas imunes no hospedeiro que culminam com a estimulação do sistema imune e produzindo efeitos antitumorais que, apesar de fracos, podem ser utilizados em combinação com agentes imunomoduladores ¹⁷⁰. O uso combinado de ferramentas ablativas com imunoterápicos já foi testada em modelos animais, incluindo o modelo de células renais Renca ^{178,180-182}. A ablação por RF combinada à imunoterapia baseada em IL2 é capaz de induzir resposta tumoral específica, levando ao aumento no número de células CD4 e CD8 no microambiente tumoral ¹⁷⁸. O uso combinado de ablação com IC foi avaliado em um modelo de tumor de cólon CT26 e em glioma murino, o GL261 ¹⁸⁰⁻¹⁸². Nos tumores de cólon, a combinação de ablação térmica com anticorpo neutralizante para PD-1 foi capaz de reduzir o crescimento tumoral e aumentou estatisticamente a sobrevida dos animais ¹⁸¹. Em tumores cerebrais, foi possível observar efeito semelhante, porém com a adição de um anticorpo inibidor de CTLA-4 ao regime de ablação com anti-PD-1. A terapia tripla também foi capaz de aumentar o infiltrado leucocitário tumoral, além de aumentar a sobrevida dos animais em 50% ^{180,182}. Interessantemente, foi demonstrado que existe a formação de memória imunológica tumor específica, ou seja, animais que apresentam sobrevida longa em virtude

da terapia, quando desafiados com uma segunda inoculação do mesmo tumor, não ocorre o desenvolvimento do tumor. Entretanto, se desafiados com uma inoculação de um tumor diferente, neste caso melanoma B16, os tumores se desenvolvem normalmente¹⁸⁰.

Ainda não existem relatos sobre o uso combinado de terapia por RF e IC tanto em ensaios clínicos quanto pré-clínicos de tumores renais.

1.7 JUSTIFICATIVA E MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA INTERAÇÃO DO SISTEMA IMUNE COM TUMORES

O tratamento local pode aumentar a imunogenicidade dos tumores, aumentando a inflamação no microambiente tumoral, e dessa maneira favorecer a modulação imunológica¹⁷²⁻¹⁷⁴. Embora o tratamento isolado com RF possa induzir uma resposta imunológica no tecido tumoral através da ablação, essa resposta é frequentemente muito modesta para eliminar completamente tumores já estabelecidos¹⁷³. Existe evidência que associação da RF e imunoterapia pode gerar uma resposta imunológica mais eficiente^{178,179,183}. Apesar disso, não há estudos avaliando essa associação utilizando como tratamento a imunoterapia baseada em IC. O intuito do presente estudo foi avaliar se a modulação do microambiente tumoral através da RF aumentaria a suscetibilidade à inibição da via PD-1 / CTLA-4 em um modelo murino ectópico de CCR.

Dessa maneira, é necessário a utilização de um modelo tumoral singênico onde a célula tumoral utilizada seja da mesma espécie do animal a ser desenvolvido o modelo, portanto trata-se de um modelo tumoral imunocompetente. Este modelo permite que sejam estudados os eventuais efeitos dos componentes celulares e humorais do sistema imune sobre o crescimento tumoral e como agentes imunomoduladores podem interferir na progressão da doença¹⁸⁴.

Já foi demonstrado previamente que células tumorais murinas apresentam diferentes capacidades de estimulação do sistema imune quando inoculadas em camundongos e também diferentes respostas à terapia baseada em agentes imunológicos. Através de análise de expressão gênica foram comparados o perfil de moléculas do sistema imune que são estimuladas pela inoculação de células tumorais, foi verificado que existem células com alta imunogenicidade, sendo as células Renca pertencentes a este grupo; e células com baixa imunogenicidade, como a célula B16 (melanoma murino). Considera-se como células com alto

perfil de imunogenicidade aquelas capazes de ativar genes de células leucocitárias (CD45), células T (CD3, CD4) e células mielóides (CD11c e CD11b), que sugerem a presença de células efetoras no microambiente tumoral, além de células dendríticas e ativação de genes co-estimulatórios (CD80, CD86, OX40L, GITRL, CD40 e CD137L). Em contrapartida, as células que pouco estimulam (ou mesmo diminuem) a expressão gênica dos efetores da resposta imune sugere que a imunidade do hospedeiro encontra-se indiferente ou insensível à presença das células tumorais. Interessantemente, as células com baixa imunogenicidade foram as que apresentaram maior velocidade de crescimento, sugerindo que a ausência de estimulação do sistema imune confere ganho de crescimento. Estratégias terapêuticas baseadas em agentes imunomodulatórios também tem diferentes respostas nas linhagens murinas. As linhagens com alta imunogenicidade foram as mais responsivas quando tratadas *in vivo* com quimiocina CCL16 (promove a infiltração leucocitária no tumor) ou com vacina de células dendríticas¹⁸⁵.

Outros estudos também utilizaram este modelo animal para novas abordagem imunoterapêuticas, incluindo o uso do bloqueio dos IC. O uso de um anticorpo neutralizante contra PD-L1 murino em combinação com everolimus (inibidor de mTOR) foi capaz de reduzir o crescimento tumoral, aumentar a infiltração leucocitária com maior prevalência de células CD8 citotóxicas¹⁸⁶. Resultados semelhantes foram observados no modelo de melanoma murino B16, onde a administração de anticorpo neutralizante contra PD-L1 foi capaz de reverter a função efetora de células CD8, diminuir o crescimento tumoral e prolongar a sobrevivência dos animais tratados^{171,187}. E também no modelo de tumor de cólon murino CT26, o uso de IC, em regime único ou combinado foi capaz de estimular a resposta imune e diminuir o crescimento tumoral¹⁸⁸. Em conjunto, esses dados indicam que os modelos animais de tumores singênicos são bons preditores de resposta ao tratamento com imunoterapia¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da terapia combinada (imunoterapia sistêmica associada a RF) no crescimento tumoral primário no modelo de inoculação ectópica de células Renca em animais Balb/c.
- Avaliar o efeito da terapia combinada (imunoterapia sistêmica associada a RF) na formação de tumores secundários após segunda inoculação ectópica de células Renca em animais Balb/c (formação de memória imunológica).

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c machos com idade entre 6 a 12 semanas. Os animais foram mantidos em biotério *Specific Pathogen Free-SPF*, onde os animais são livres de patógenos específicos, para os quais os mesmos são periodicamente testados. Os camundongos foram mantidos em microisoladores à temperatura controlada de 22° C e sob ciclo de luz de 12 horas, tratados com água autoclavada e ração irradiada *ad libitum*. A manipulação dos animais respeitou o manual de boas práticas científicas em uso de animais indicada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimental Animal-CONCEA. O projeto foi avaliado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA – processo número 078/18. Anexo 1).

3.2 CÉLULAS

Foram utilizadas as células Renca (ATCC® CRL-2947, *Mus musculus* kidney renal adenocarcinoma), as células foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa úmida a 37° C e 5% de CO₂. Estoques foram mantidos criopreservados em nitrogênio líquido.

3.3 INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA E CRESCIMENTO TUMORAL

As células Renca foram implantas na densidade mínima 1 x 10⁶ células subcutaneamente em um volume de 0,1 mL de PBS estéril, em região do flanco de cada animal. Os animais foram observados pelo menos 3 vezes por semana, e aqueles que apresentaram crescimento tumoral foram monitorados. Para aferição do volume tumoral foi utilizado paquímetro manual digital. O volume tumoral foi calculado de acordo com a fórmula

L x W x C, onde L é a maior dimensão, W é o comprimento perpendicular à L e C altura ou profundidade.

3.4 ABLAÇÃO POR RF

A ablação foi realizada utilizando uma agulha Rita SDE com ponta ativa de 1 a 3 cm de 17 Gauge da Angiodynamics, inserida diretamente pela superfície da pele onde localiza-se o centro do tumor do animal anestesiado com Ketamina e xilazina. Os parâmetros utilizados durante a RF foram 5 W (300 J) por 1 min. Os procedimentos foram realizados com gerador de alta frequência RITA 1500X da AngioDynamics, gentilmente cedido pela empresa Vita Médica, a qual forneceu também a agulha que foi utilizada exclusivamente para este estudo.

3.5 TRATAMENTO COM ANTICORPOS NEUTRALIZANTES

O bloqueio de PD-1 foi realizado pela administração intraperitoneal de oito doses de 200 µg de anti-mPD-1 (clone 6A1_RAS_Ab_11, Bristol-Myers-Squibb) e anti-mCTLA4 (clone 12C11_RAS_Ab_04, Bristol-Myers-Squibb) a cada 3 dias. A medicação foi cedida pela empresa Bristol-Myers-Squibb através da concessão de um *grant Non Clinical Research Proposal*.

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos a aplicação subcutânea em flanco direito de células Renca, conforme protocolo descrito de inoculação subcutânea de células tumorais. Quando os tumores atingiram um volume aproximado de 0,5 cm³ os animais foram randomizados em três grupos experimentais e submetidos aos protocolos de tratamento definidos para cada grupo:

- Grupo 1 (controle): ausência de tratamento (n = 15).
- Grupo 2 (intervenção): Imunoterapia sistêmica isolada consistindo na administração de anticorpos anti-PD1 e anti-CTLA-4 (n =17).
- Grupo 3 (intervenção): Imunoterapia sistêmica consistindo na administração de anticorpos anti-PD1 e anti-CTLA-4 associada a RF do implante tumoral ectópico (n = 15).

Após o término do protocolo de tratamento estabelecido para cada grupo, os animais foram observados e submetidos à cirurgia para remoção dos tumores residuais. Caso o tumor apresentasse crescimento até 1 cm^3 era realizado a remoção cirúrgica do tumor.

Após 14 dias do fim dessa primeira fase, os animais foram reinoculados através de protocolo idêntico a primeira aplicação de células tumorais, porém no flanco esquerdo. Os animais foram observados pelo menos 3 vezes por semana para avaliar o crescimento tumoral. O objetivo foi avaliar a influência do primeiro tratamento sobre o crescimento do tumoral após a segunda aplicação de células tumorais. O volume tumoral foi monitorado por até 3 meses ou até os tumores atingirem 1 cm^3 (Figura 9).

Importante ressaltar que, neste momento, não temos dados para cálculo do tamanho do efeito das terapias. Por esse motivo este estudo foi um ensaio-piloto com o objetivo adicional de determinar o tamanho do efeito para análise estatística de futuros projetos de estudo na mesma linha de pesquisa. A definição do número de indivíduos por grupo foi baseada em artigos científicos que relatam ensaios semelhantes, onde o número de animais nestes trabalhos variou de 4 a 18^{180,182,186}. Além disso, a recomendação da CEUA da Fundação Antônio Prudente determina que o tamanho mínimo para um ensaio piloto é 10 animais por grupo experimental, o que foi seguido no atual estudo. 4- 186-9

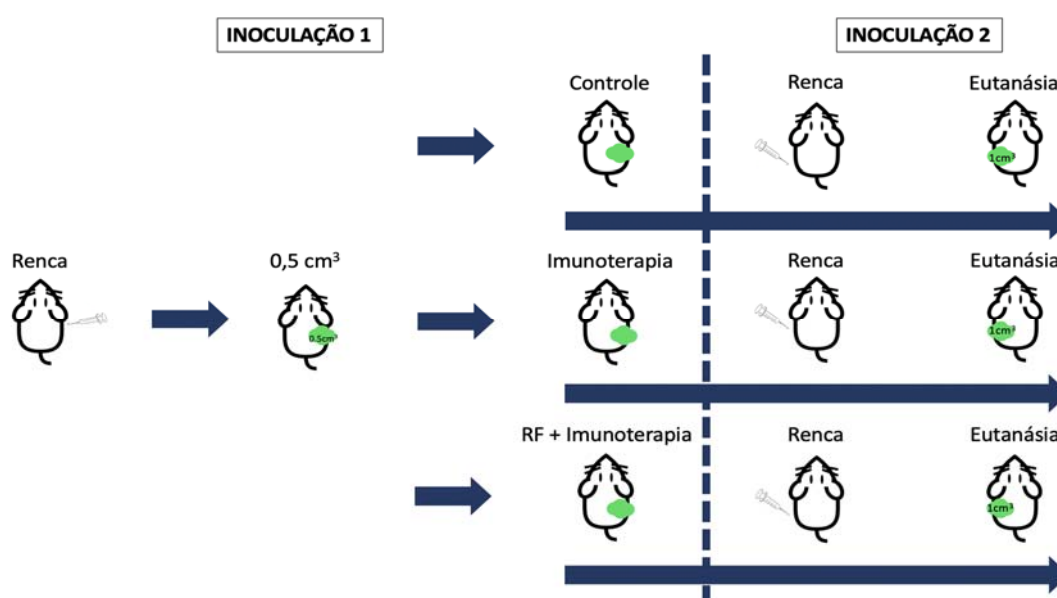


Figura 9 - Fluxograma do desenho experimental

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O desfecho primário foi baseado na ocorrência do evento formação de tumor secundário (células tumorais reinoculadas em flanco esquerdo). Os grupos avaliados foram comparados em relação ao número total de animais com formação do tumor secundário e adicionalmente calculado a taxa de sobrevida livre de formação do tumor secundário (expressa em número de dias), utilizando como evento a formação de tumor secundário. A análise de sobrevida foi calculada através do estimador de KAPLAN E MEIER para estimar a chance de um indivíduo apresentar a formação de um tumor secundário em determinado período de tempo, truncado em até 90 dias. Através da representação gráfica do estimador, avaliamos, para cada grupo estudado, a probabilidade de um indivíduo não desenvolver o tumor secundário no mesmo período descrito acima. Quanto mais superior for a curva no gráfico, maior é a chance de estar livre de formação do tumor até o tempo considerado. A comparação entre as curvas foi realizada utilizando o teste não-paramétrico de Log-Rank, e o nível de significância adotado foi de 5%. Para comparação de variáveis numéricas entre os grupos foi utilizado o teste one-way ANOVA quando a distribuição das medidas de crescimento tumoral fosse paramétrica ou Kruska-Wallis se fosse não-paramétrica seguida de pós hoc test de Bonferroni. Para a avaliação de variáveis categóricas foi utilizado o teste de qui-quadrado, seguido do teste de Fisher. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIO PARA AVALIAR O PERFIL DE CRESCIMENTO TUMORAL DA CÉLULA RENCA

Inicialmente realizada a padronização do crescimento tumoral da célula Renca em animais Balb/c. A proposta inicial era de realizar implantes bilaterais onde o tumor do lado direito seria submetido a RF e o efeito das terapias seria avaliado no tumor contralateral. Para estabelecer esta condição, foi realizado um ensaio para comparar o perfil de crescimento tumoral em animais com tumores unilaterais vs. bilaterais, com o intuito de verificar se a cinética de crescimento tumoral em animais inoculados com dois tumores é semelhante ao crescimento tumoral de um único tumor. Para tanto, utilizamos dez animais divididos em dois grupos, grupo 1P e 2P, cada um com cinco animais. Os animais do grupo 1P receberam uma injeção subcutânea unilateral de 1×10^6 de células tumorais na região do flanco lateral direito. Os animais do grupo 2P receberam duas injeções subcutâneas, uma em cada região do flanco (direito e esquerdo) de 1×10^6 de células tumorais.

Todos os animais do grupo 1P desenvolveram tumores a partir da segunda semana. O perfil do crescimento tumoral foi heterogêneo entre os animais quanto a velocidade de crescimento (Figura 10). Dois padrões de crescimento foram observados, animais com um padrão de crescimento mais rápido e outro com crescimento um pouco mais lento. Além disso conforme os tumores atingiam volumes maiores apresentaram uma tendência a ficarem ulcerados e necrosados (Figura 11). Os animais foram submetidos a ressecção cirúrgica do tumor em flanco direito quando a lesão atingiu o volume de 1 cm^3 . O material ressecado foi avaliado por patologista experiente (Dra. Stephania Martins Bezerra) sendo identificado uma neoplasia maligna indiferenciada (Figura 12).

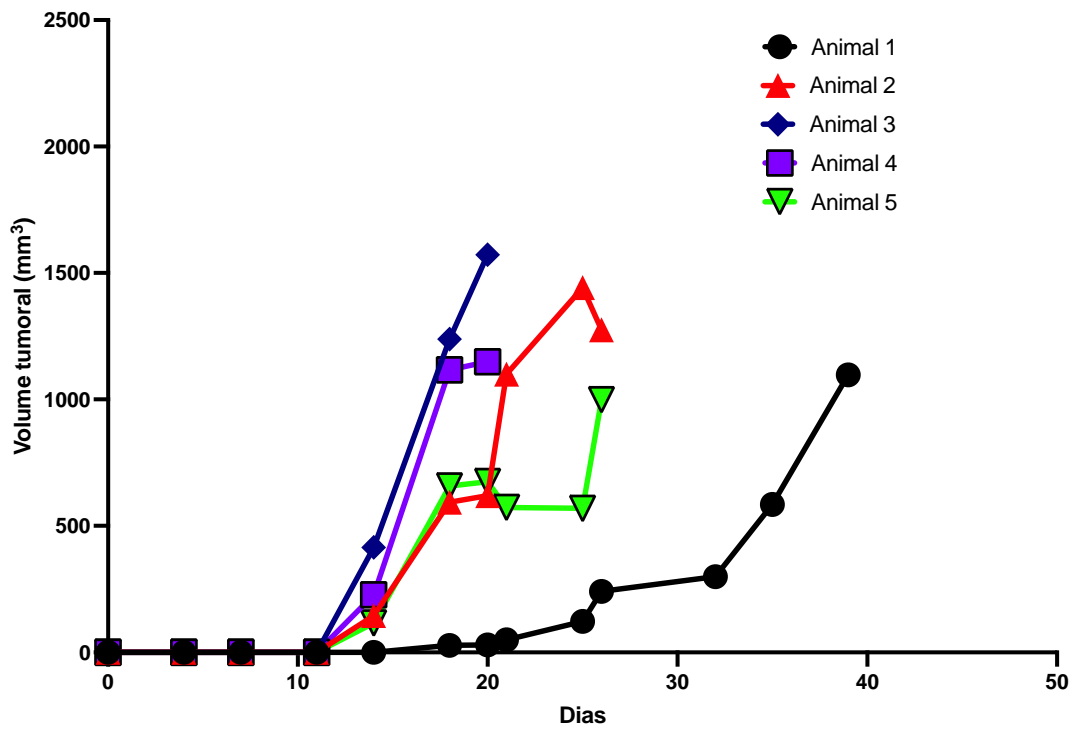


Figura 10 - Perfil do crescimento tumoral da linhagem Renca nos camundongos do grupo 1P

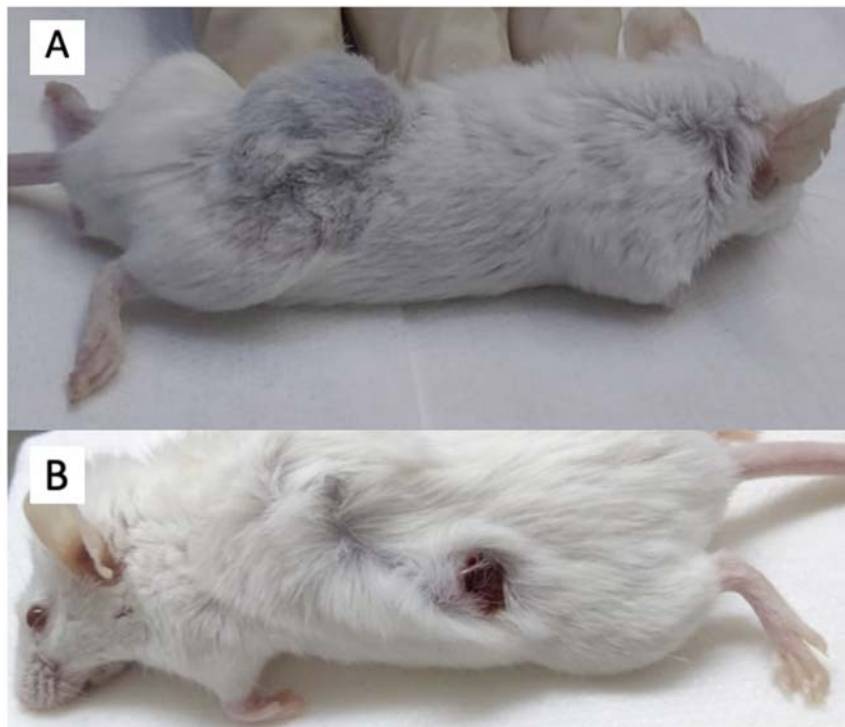


Figura 11 - Imagem do tumor renal em flanco do animal: A – Camundongo apresentando tumor em crescimento em topografia de flanco direito. B – Tumor estabelecido com área de ulceração

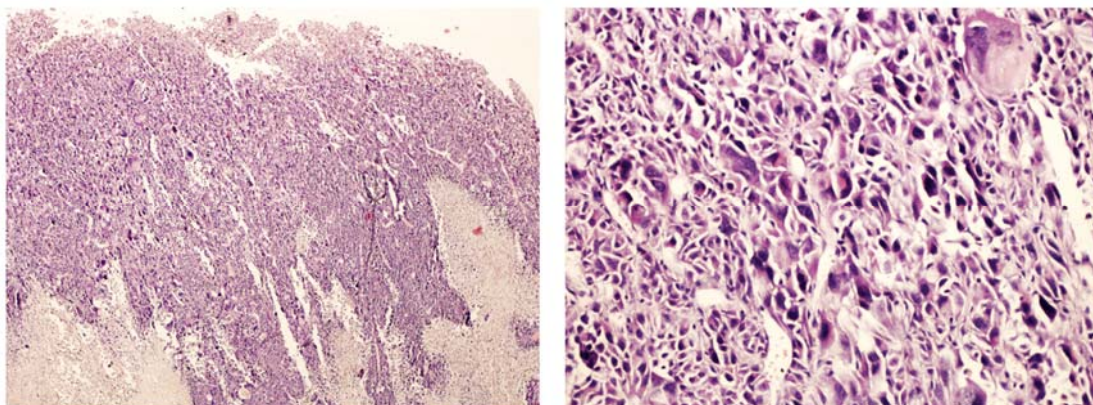


Figura 12 - Histologia do tumor subcutâneo em flanco direito de animal submetido a ressecção cirúrgica exclusiva: observa-se uma neoplasia maligna indiferenciada, com padrão sólido de crescimento, extenso pleomorfismo celular, com multinucleação e inúmeras figuras de mitose, associada a extensas áreas de necrose

Em relação ao grupo 2P, não foi possível determinar o perfil de crescimento tumoral do grupo de animais injetados bilateralmente, pois houve muita variabilidade de crescimento entre tumores do mesmo animal (Figura 13). Houve casos de crescimento extremamente rápido de um dos tumores, enquanto o contralateral não cresceu (animal 1, linhas pretas) e os tumores dos animais 2 (linhas vermelhas), 3 (linhas azuis) e 5 (linhas verdes) cresceram em padrões diferentes. Por conta desse comportamento irregular do crescimento dos tumores com inoculação bilateral, abandonamos esse modelo e substituímos por um ensaio com dois ciclos de inoculação que se mostrou mais eficiente e foi utilizado para todo o restante deste trabalho.

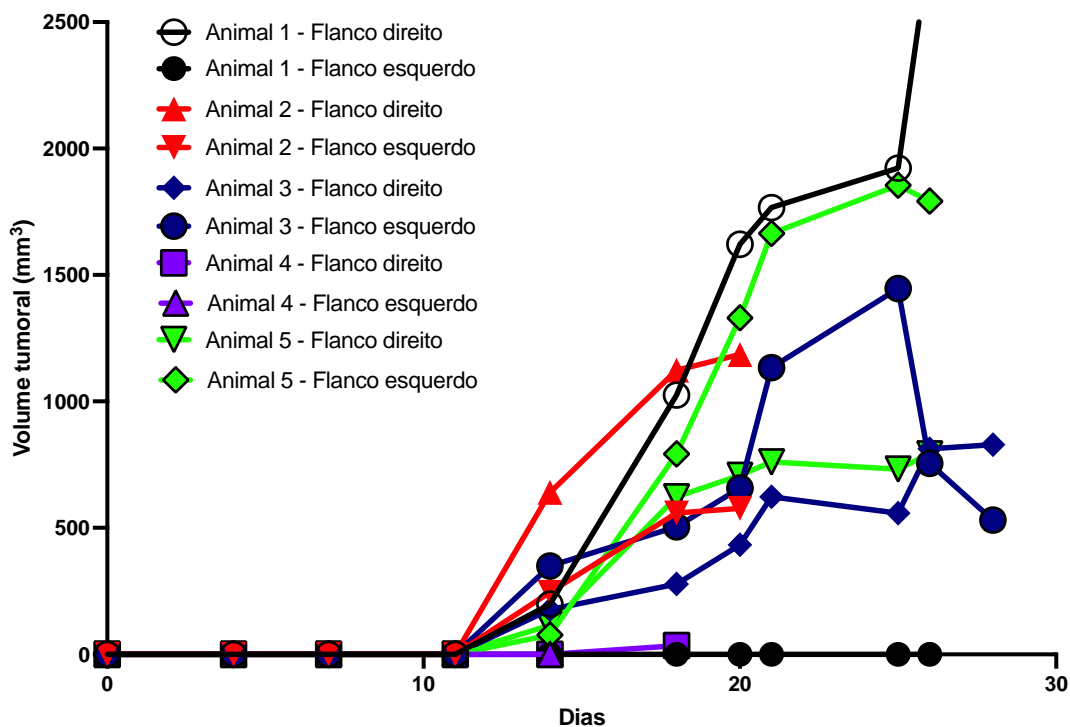


Figura 13 - Perfil do crescimento tumoral da linhagem Renca nos camundongos do grupo 2P. Cada animal está representado por duas linhas, sendo uma o tumor do flanco esquerdo e outra do flanco direito

4.2 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ABLAÇÃO POR RF

Para padronização da terapia ablativa por RF do tumor subcutâneo foi formado um grupo experimental de 4 animais. Os animais desse grupo receberam uma injeção subcutânea unilateral de 1×10^6 de células tumorais na região do flanco lateral direito e foram observados até o tumor atingir o volume de $0,5 \text{ cm}^3$, quando foram submetidos ao procedimento ablativo. Para isso foi utilizado o gerador de RF RITA 1500X da AngioDynamics. O gerador funciona transmitindo o sinal de RF para uma agulha de eletrocirurgia estéril (dispositivo eletrocirúrgico uniblate) de 1,0 a 3,0 cm e gauge 17, gerando calor. Para que o sinal se propague pelo corpo do animal é necessário a utilização de um eletrodo de dispersão estéril (thermopad) onde o animal é posicionado para implantação da agulha (Figura 14). O procedimento foi realizado com os animais anestesiados com o coquetel de cetamina e xilazina. Os parâmetros utilizados durante a RF foram 5 W (300 J) por 1 minuto.



Figura 14 - Imagens representativas do procedimento de radioablação: mostrando o gerador de RF (acima à esquerda), a agulha de eletrocirurgia utilizada no procedimento (abaixo à esquerda) e o animal anestesiado e posicionado no fluxo laminar para realização do procedimento de radioablação com a agulha inserida no centro do tumor (acima à direita)

A taxa de crescimento tumoral foi homogênea entres os 4 animais. Após a realização da terapia ablativa o crescimento tumoral foi monitorado sendo observado bloqueio do crescimento tumoral no animal 2 e 4 e diminuição tumoral nos animais 1 e 3 (Figura 15).

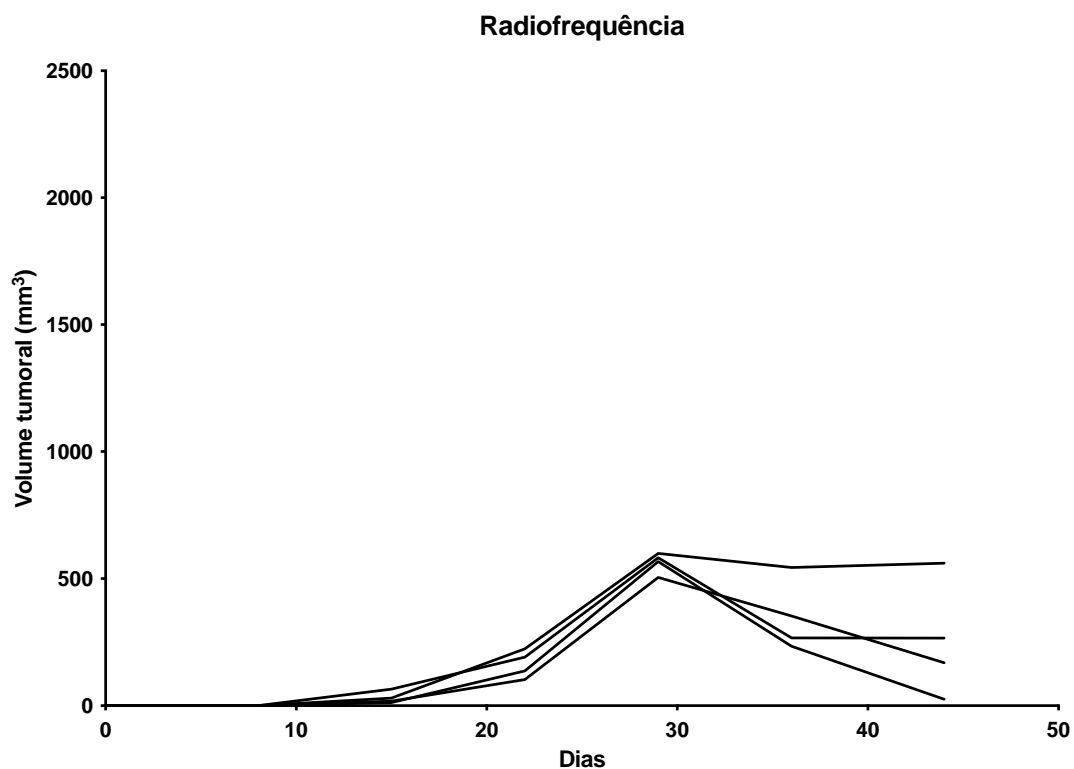


Figura 15 - Crescimento tumoral da linhagem Renca nos camundongos submetidos a RF no grupo 1R

Para assegurar a morte das células neoplásicas pelo tratamento ablativo, os animais foram submetidos a ressecção cirúrgica da área submetida a RF em flanco direito para avaliação de tumor residual. O material ressecado foi avaliado pela mesma patologista não sendo identificado células tumorais viáveis (Figura 16).

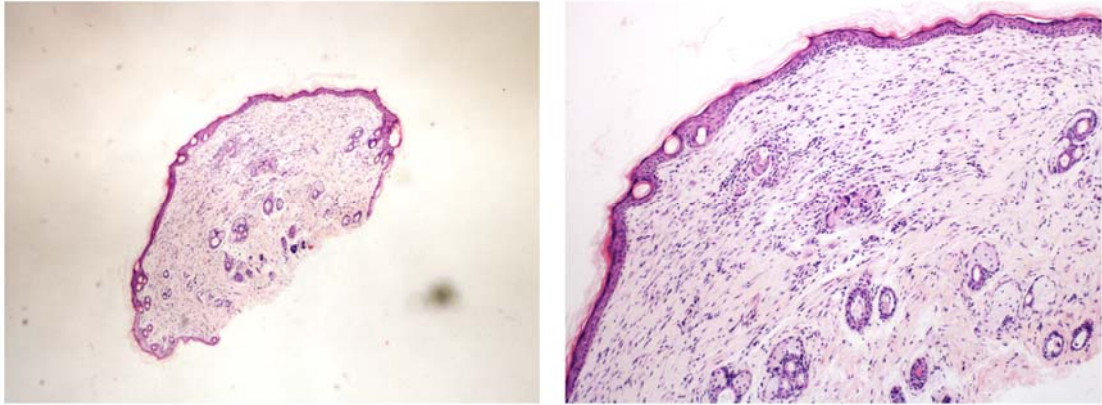


Figura 16 - Histologia do tumor subcutâneo em flanco direito de animal submetido a RF exclusiva: observa-se a pele e tecido celular subcutâneo exibindo anexos cutâneos e uma fibrose dérmica de padrão cicatricial, associada a um processo inflamatório crônico com reação gigantomcelular do tipo corpo estranho. Ausência de células neoplásicas

Por se tratar de um tumor agressivo e de crescimento rápido, a regressão do volume tumoral associado a avaliação histopatológica com ausência de células neoplásicas viáveis indica que o procedimento de radioablação interrompeu o crescimento tumoral. A figura 17 mostra a evolução da lesão tumoral após o procedimento de RF.

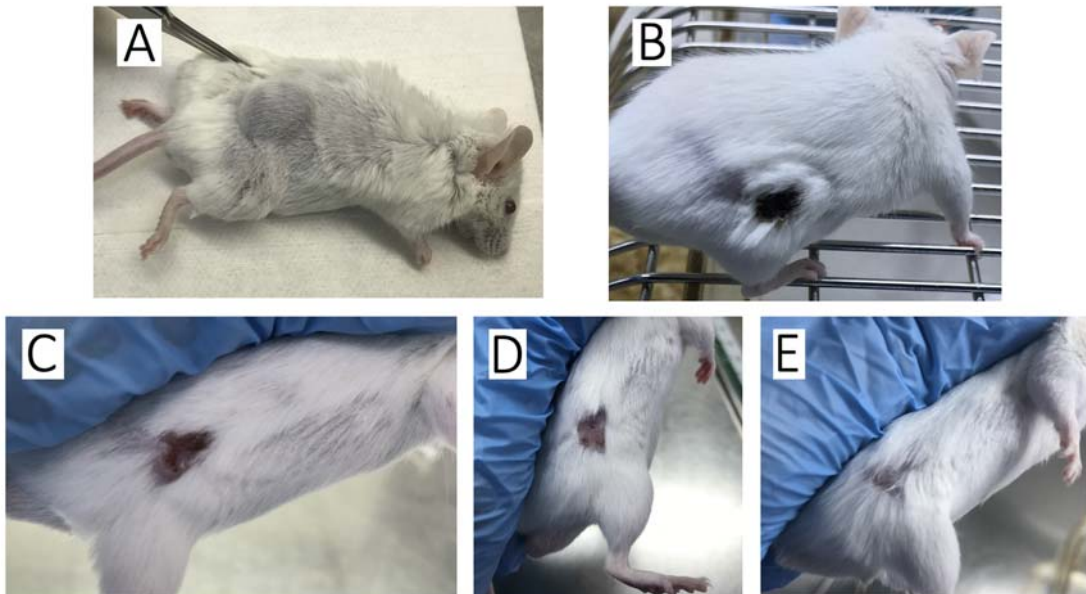


Figura 17 - Evolução da lesão tumoral após RF. Imagem A – pré RF. Imagem B – 14 dias após procedimento. Imagem C – 21 dias após procedimento. Imagem D – 28 dias após procedimento. Imagem E – 35 dias após procedimento

4.3 EFEITO DAS TERAPIAS INDIVIDUAIS SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL PRIMÁRIO

Para avaliação do efeito da terapia combinada (imunoterapia sistêmica associada a RF) no crescimento tumoral primário foram utilizados 49 animais atribuídos a um dos três grupos de estudo (controle, imunoterapia isolada, RF associado a imunoterapia). Todos os animais apresentaram crescimento tumoral após inoculação das células tumorais, com início do crescimento a partir do décimo quarto dia do experimento. O tratamento proposto para cada grupo foi iniciado quando os tumores atingiram o volume alvo de $0,5 \text{ cm}^3$. Para isso os animais foram randomizados nos grupos de estudo sendo o grupo 1 composto por 15 animais e o grupo 2 e 3 composto por 17 animais cada grupo.

A velocidade de crescimento tumoral foi heterogênea entre os animais, atingindo o volume alvo para início de tratamento em dois picos diferentes com intervalo de uma semana. As Figuras 18 a 21 ilustram o perfil de crescimento tumoral dos grupos avaliados no período da primeira inoculação tumoral.

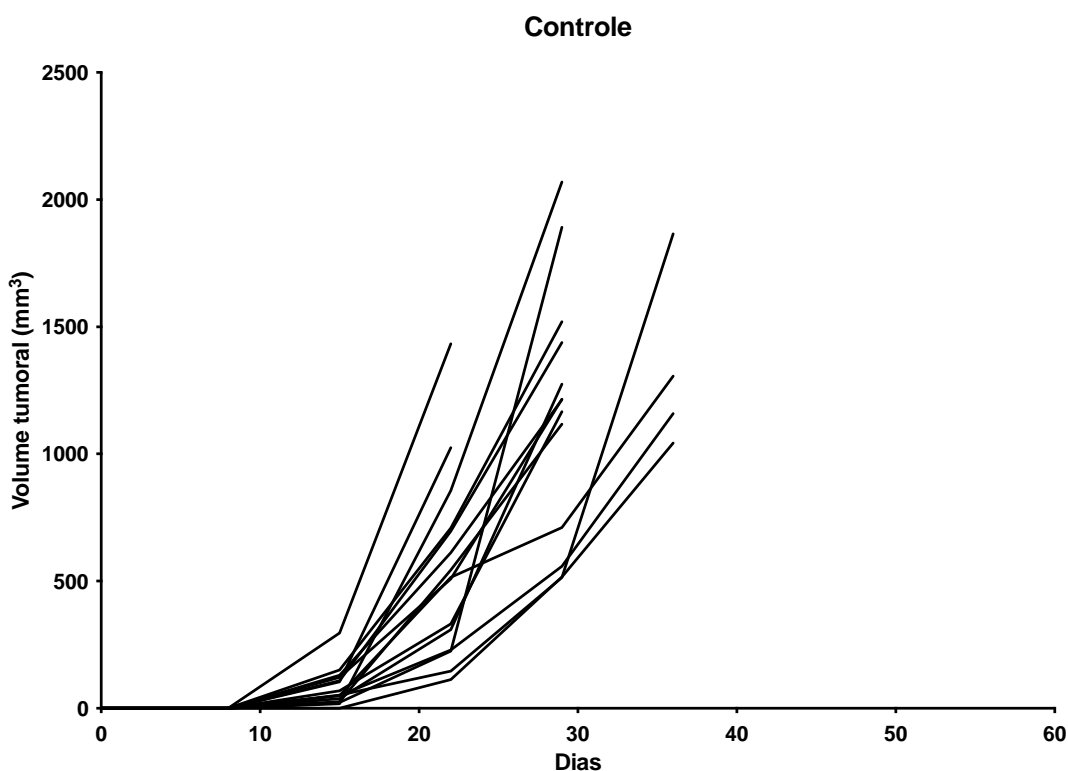


Figura 18 - Crescimento tumoral individual de cada animal durante a primeira aplicação de células tumorais do grupo 1

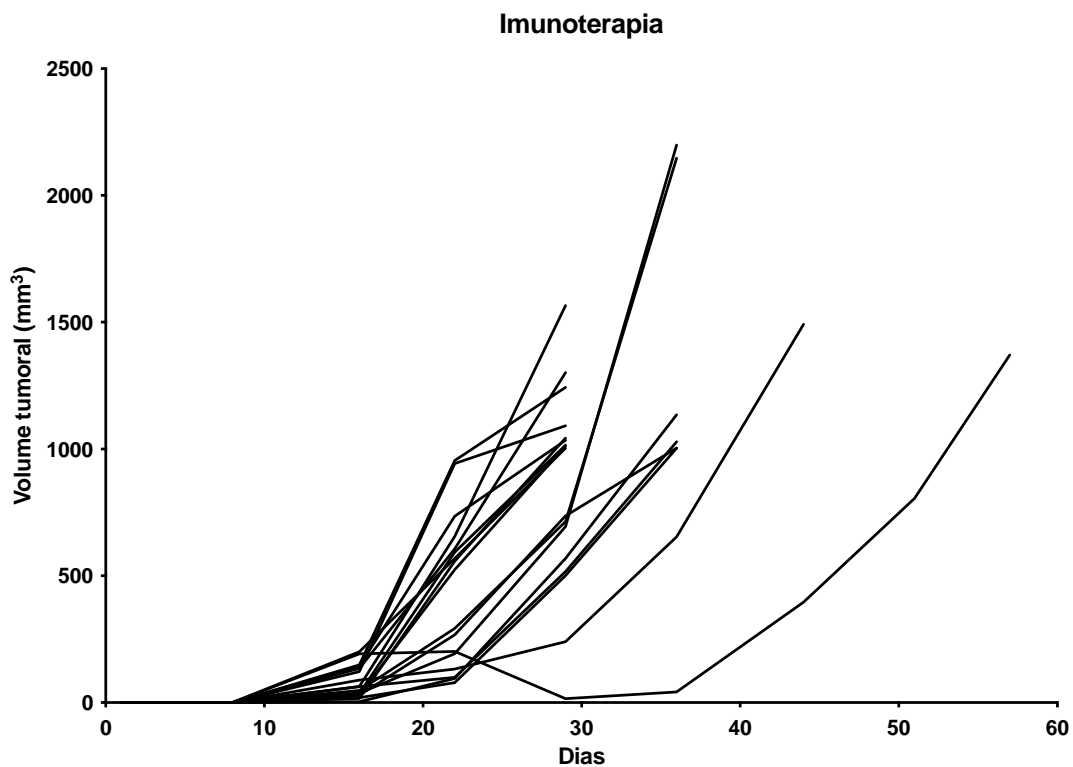


Figura 19 - Crescimento tumoral individual de cada animal durante a primeira aplicação de células tumorais do grupo 2

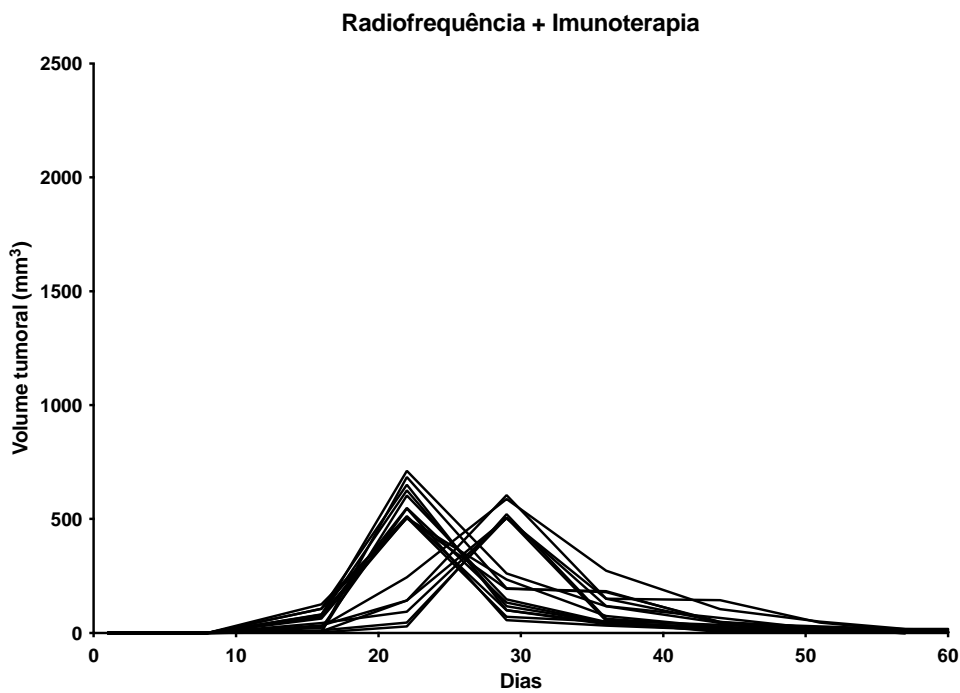


Figura 20 - Crescimento tumoral individual de cada animal durante a primeira aplicação de células tumorais do grupo 3

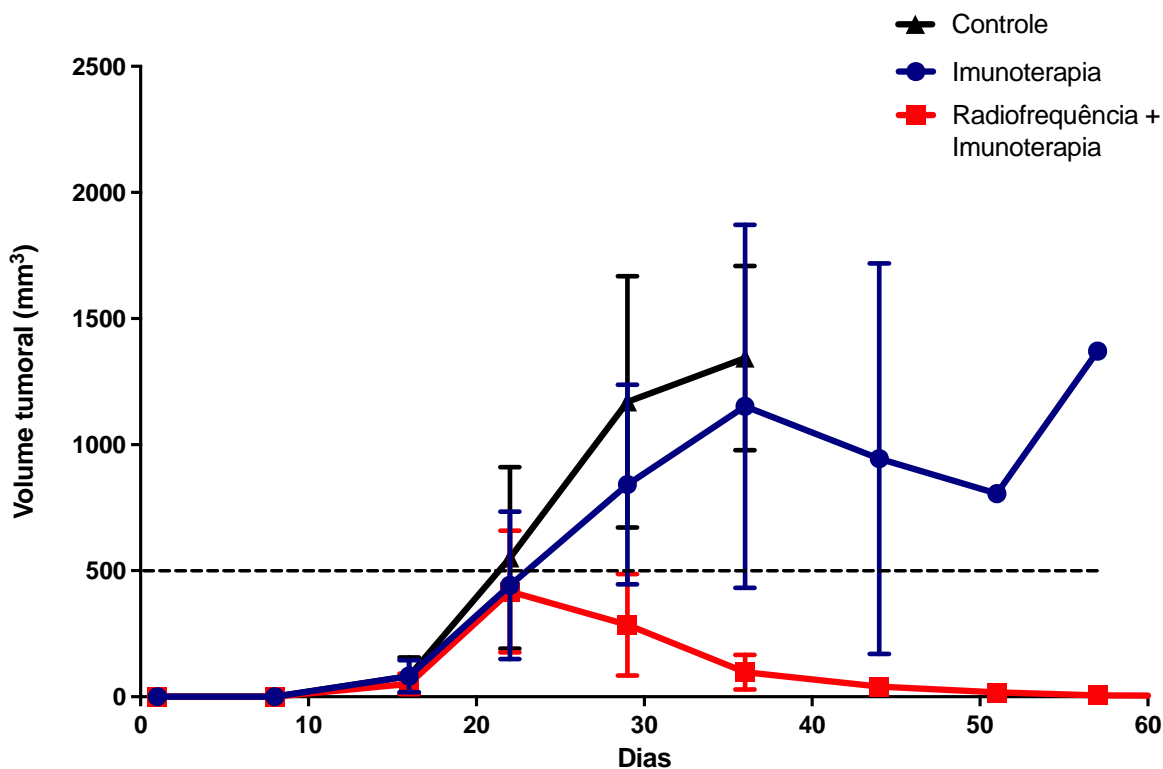


Figura 21 - Média do crescimento tumoral dos grupos 1, 2 e 3 durante a primeira aplicação de células tumorais

Os animais submetidos ao protocolo com imunoterapia isolada apresentaram tendência de uma menor velocidade de crescimento (mm^3/dia) do tumor primário que o grupo controle. Contudo, não houve diferença estatística entre a velocidade de crescimento entre esses dois grupos ($p = 0,365$, Figura 22). O tratamento isolado com imunoterapia não foi suficiente para impedir o crescimento tumoral na fase da primeira inoculação.

A resposta ao tratamento do tumor primário foi melhor no grupo submetido a RF associado a imunoterapia. Esses animais foram acompanhados após início do tratamento combinado sendo que todos apresentaram redução progressiva do volume tumoral.

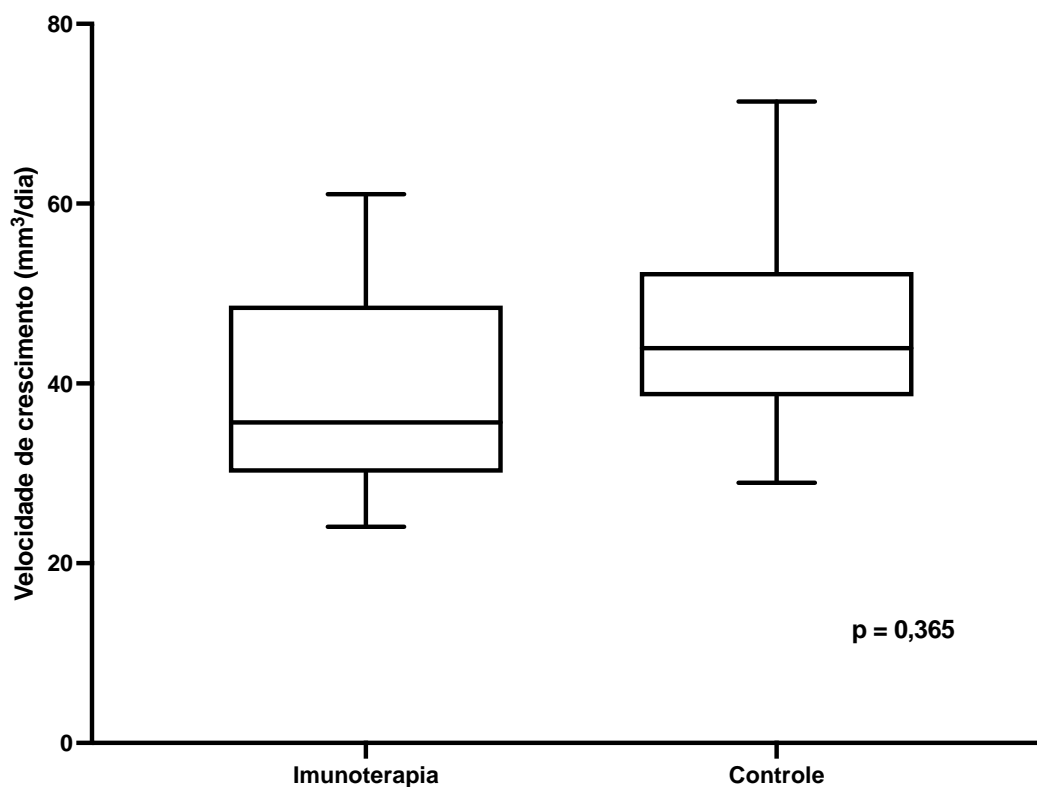


Figura 22 - Velocidade de crescimento do tumor primário do grupo 1 e 2

4.4 EFEITO DAS TERAPIAS INDIVIDUAIS SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL SECUNDÁRIO E RESPOSTA DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA

Após o término do tratamento primário os animais foram observados por 2 semanas. Apenas um animal do grupo 1 apresentou recidiva tumoral em flanco direito. Após a reinoculação com células Renca, a taxa de crescimento tumoral foi significativamente menor nos grupos submetidos a intervenção do que no grupo controle [0,0% vs. 0,0% vs. 73,3%, respectivamente (Figura 23)]. Após a reinoculação onze animais apresentaram crescimento do tumor em flanco esquerdo no grupo controle. Não houve crescimento de tumor na topografia de flanco esquerdo após a reinoculação tumoral em nenhum dos animais dos grupos submetidos a imunoterapia associada a RF ou imunoterapia isolada (Tabela 4).

Tabela 4 - Recidiva tumoral após tratamento primário e crescimento tumoral após segunda aplicação de células neoplásicas nos grupos de estudo

Grupos	Recidiva Tumoral, n (%)	Tumor Secundário, n (%)
Grupo 1 (n=15)	1 (6,66%)	11 (73,3%)
Grupo 2 (n=17)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Grupo 3 (n=17)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

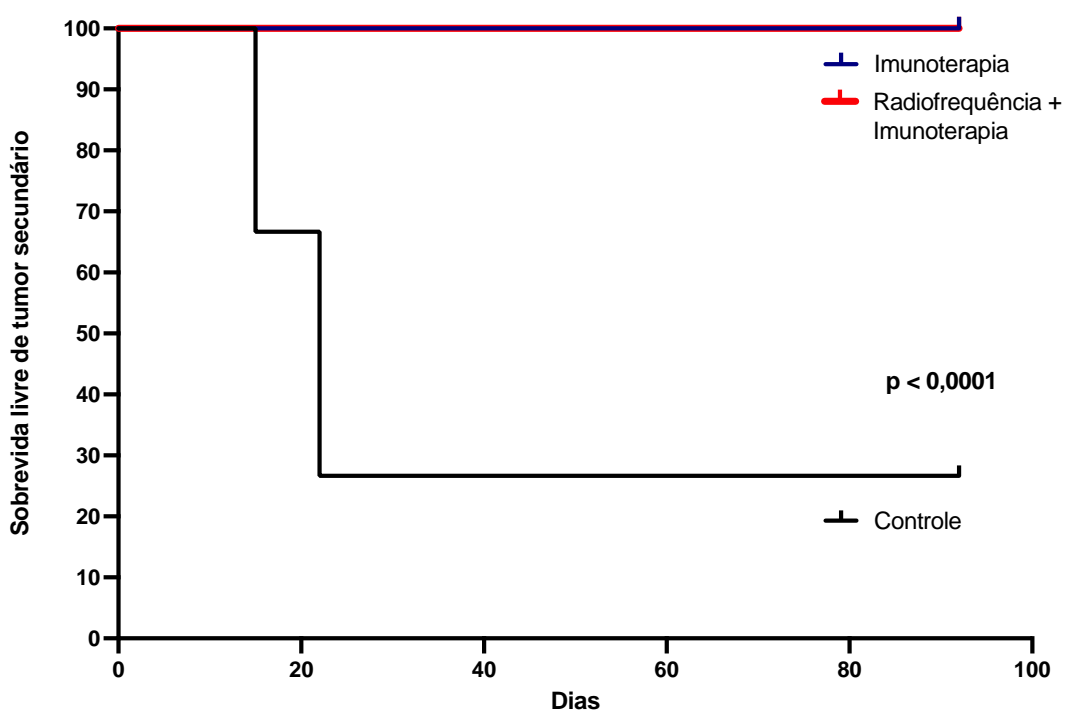


Figura 23 - Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida livre de tumor secundário comparando os grupos avaliados

O grupo 1 foi o único que apresentou animais com crescimento tumoral após a reinoculação tumoral em flanco esquerdo. Nesses animais observamos diferença estatística na velocidade de crescimento tumoral (mm^3/dia) entre a primeira e segunda aplicação de células tumorais, sendo menor na reinoculação ($p = 0,008$. Figuras 24 e 25). A análise histológica dos tumores secundários demonstrou uma neoplasia com as mesmas características do tumor ressecado em flanco direito (Figura 26).

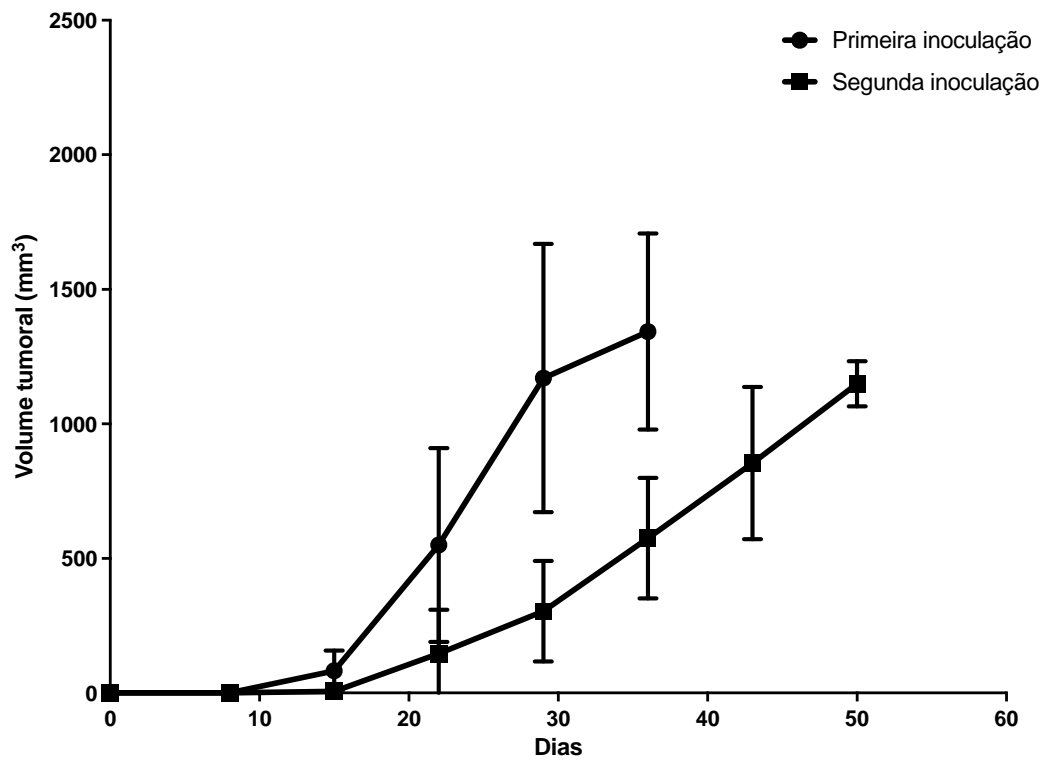


Figura 24 - Média do crescimento tumoral dos animais do grupo 1 após a primeira e segunda inoculações com células tumorais

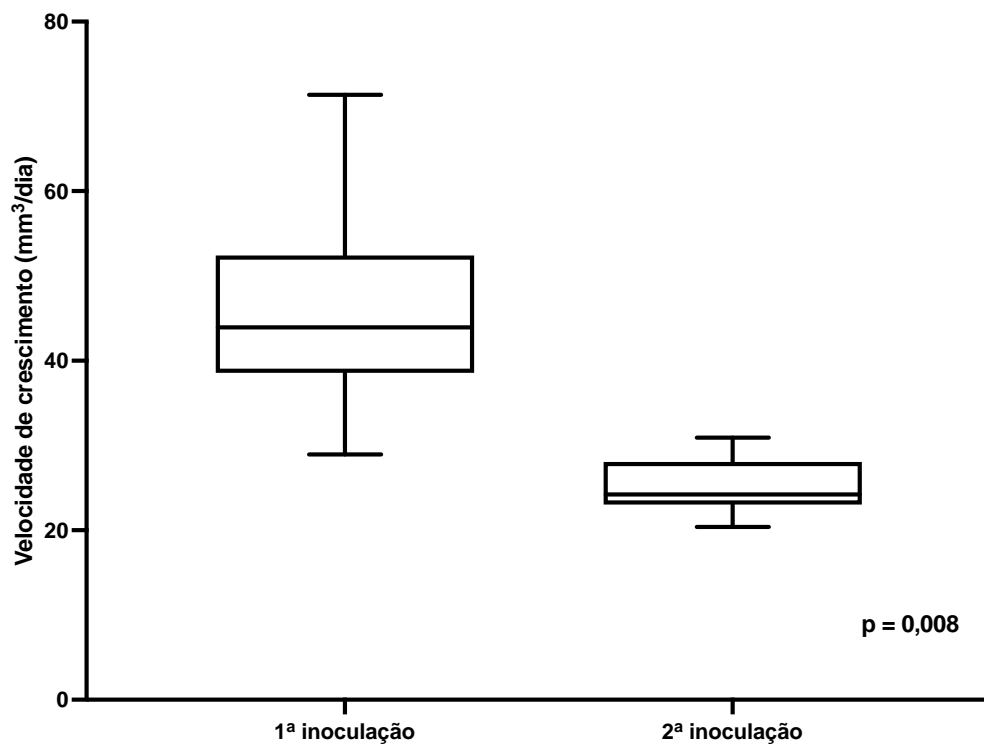


Figura 25 - Velocidade de crescimento do tumor durante primeira e segunda inoculação no grupo 1

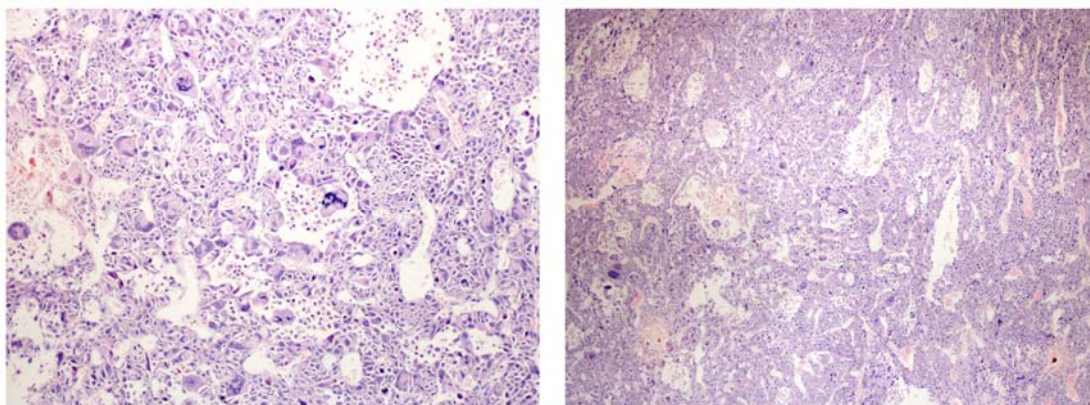


Figura 26 - Histologia do tumor subcutâneo em flanco esquerdo de animal submetido a ressecção cirúrgica exclusiva: observa-se uma neoplasia com as mesmas características do tumor ressecado em flanco direito, indiferenciada, pleomórfica, com multinucleação e inúmeras figuras de mitose atípicas

5 DISCUSSÃO

Desde que a regressão de metástases após terapias ablativas foi observada em pacientes, pesquisadores vem estudando a resposta imune em modelos animais com objetivo de desvendar os mecanismos do efeito imunoablativo ^{175,189,190}. Nosso modelo de estudo avaliou o tratamento do tumor primário através da RF associado ao uso de IC. Foi realizado uma segunda inoculação em flanco contralateral para avaliar o efeito de memória imunológica desencadeado pelo tratamento primário. Assim, a segunda aplicação de células tumorais em nosso modelo representa uma recidiva tumoral ou micrometástase nascente que pode se desenvolver durante o acompanhamento do paciente após tratamento inicial. Nosso estudo mostrou que a terapia de combinação entre RF e IC, assim como a monoterapia com IC, produziram imunidade sistêmica e rejeição do tumor em uma segunda aplicação no modelo murino para CCR com células Renca.

Observamos em nosso modelo ectópico pequenos tumores subcutâneos a partir do décimo quarto dia do experimento com crescimento progressivo e exponencial com tendência a se tornarem ulcerativos e necrosados, assim como já descrito por Hillman et al. ¹⁹¹. Além disso, as células implantadas no subcutâneo não induziram processo metastático detectável. Em relação ao modelo com aplicação simultânea bilateral de células tumorais nos animais identificamos uma grande variabilidade do crescimento entre tumores do mesmo animal. Por esse motivo optamos por não utilizar esse modelo de estudo. Apesar disso, esse resultado sugere que exista alguma influência de um tumor sobre o crescimento do tumor contralateral. Existem relatos na literatura deste fenômeno em outros modelos tumorais murinos, como o melanoma B16 ¹⁹². Isso também fortalece nossa hipótese, pois se tumores originados da mesma célula podem influenciar o crescimento de outro tumor à distância, o tratamento local de um tumor pode causar alterações no padrão de desenvolvimento de tumores do mesmo indivíduo.

Foi observado uma tendência de uma menor velocidade de crescimento tumoral durante a primeira aplicação de células tumorais do grupo submetido a imunoterapia isolado em relação ao grupo controle. Contudo essa tendência não foi estatisticamente significativa em nosso modelo. Apesar disso, outros estudos descreveram a diminuição do crescimento tumoral de células Renca utilizando IC. Nesses estudos o início do tratamento ocorreu quando

os tumores apresentavam no máximo 100 mm³, enquanto em nosso modelo o volume alvo para iniciar o tratamento foi de 500 mm³ ^{186,193–195}. Isso pode ter contribuído para não identificarmos diferença estatística em relação ao crescimento do tumor primário no grupo 1 e 2, podendo significar que carga tumoral já era muito alta no momento que o tratamento foi iniciado.

O grupo submetido a terapia combinada com imunoterapia e RF apresentou redução progressiva do volume tumoral após o início do tratamento. Esse resultado já era esperado, principalmente, em consequência do efeito ablativo induzido pela RF que já é bem estabelecido. Apesar disso, descrevemos a padronização dos parâmetros necessários para realização do tratamento com RF em um modelo murino ectópico de CCR.

A introdução e sucesso do tratamento com uso da imunoterapia em vários tumores no cenário metastático, principalmente baseada nos inibidores de checkpoint, vem cada vez mais despertando o interesse para novos estudos com objetivo de induzir respostas imunes antitumorais e formação de uma memória imunológica ^{172,176}. Para avaliar a resposta imunológica causada pela criação Kim et al utilizaram um modelo murino ectópico. Nesse estudo foram utilizados 60 camundongos Balb / c que receberam aplicação subcutânea com células tumorais da linhagem RENCA em flanco esquerdo. Esses animais foram submetidos a criação ou ressecção cirúrgica dos tumores. Os camundongos tratados com sucesso foram submetidos a uma nova aplicação com células tumorais da linhagem RENCA apresentando uma taxa de crescimento do tumor significativamente maior no grupo de excisão cirúrgica do que no grupo de criação (94,4% vs. 11,1%, p = 0,001). Além disso uma parcela dos animais submetidos a criação foi inoculada com uma linhagem celular indiferenciada de carcinoma de cólon (CT26) em flanco direito. Esse grupo apresentou um crescimento tumoral em 94,1% dos animais, significativamente maior que o grupo submetido a reaplicação com células RENCA, demonstrando assim que a resposta imunológica foi tumor específica ¹⁹⁶. Em outro estudo, realizado por Kroeze et al. ¹⁷⁸, foi avaliado se associação da RF combinado com interleucina-2 induziria uma resposta imune antitumoral forte o suficiente para prevenir a formação de metástases ou diminuir o crescimento de metástases pulmonares estabelecidas. Foi utilizado um modelo murino ortotópico de CCR, onde os animais foram tratados através da associação de RF e interleucina-2, ablação isolada por RF, monoterapia com interleucina-2 ou nenhum tratamento como controle. Os autores concluíram que o tratamento combinado gerou uma resposta imune antitumoral sistêmica ao CCR maior que a monoterapia com

interleucina-2. As metástases pulmonares foram significativamente menores e apresentaram menor formação quando usado a terapia combinada. Com o mesmo objetivo O'Shaughnessy et al.¹⁹⁵ utilizou um modelo murino ortotópico de CCR. O tumor primário foi tratado com associação de uma terapia ablativa, terapia fotodinâmica com alvo vascular (VTP) associado anticorpos antagonistas de PD1 e PD-L1, VTP apenas, ou uso isolado dos anticorpos antagonistas de PD1 e PD-L1. Apenas a terapia combinada resultou na regressão do tumor primário e impediu o crescimento de metástases pulmonares. Em nosso estudo foi utilizado a RF como fonte de ablação dos tumores associada ao uso de IC. Demonstramos que os tratamentos com RF associado a imunoterapia e a monoterapia com IC apresentaram menor crescimento tumoral na reaplicação quando comparados ao grupo que não realizou tratamento. Dessa maneira podemos inferir que existe influência desses tratamentos na formação de uma memória imunológica. A hipótese principal de nosso estudo era que o tratamento com RF pudesse potencializar o efeito dos IC gerando uma resposta imunológica mais eficiente. Contudo, isso não foi observado em nosso modelo uma vez que o tratamento combinado não foi superior a monoterapia com IC no que diz respeito a formação de tumores após a reinoculação das células tumorais. Ao contrário dos nossos resultados, os estudos citados acima apresentaram uma melhor resposta com o uso da terapia combinada, terapia ablativa mais imunoterapia. Contudo foi utilizado um modelo de estudo diferente do nosso, o modelo ortotópico, que sabidamente gera metástases espontâneas. A literatura não dispõe de dados avaliando se o local de implantação das células tumorais pode afetar a resposta imunológica, podendo isso ser um motivo da diferença dos resultados apresentados. Apesar disso, nossos resultados reforçam que a imunoterapia gera uma resposta imune efetiva prevenindo a formação de tumores quando os animais são submetidos a uma segunda inoculação com células tumorais, simulando uma recidiva tumoral. Dessa maneira, esses dados fornecem embasamento para utilização da imunoterapia como um possível tratamento adjuvante após terapia primária no CCR em pacientes com alto risco de recidiva. Atualmente não existe um tratamento com eficácia comprovada nesse cenário. Como já discutido existem estudos em andamento avaliando o papel dos IC como terapia adjuvante, que devem ter seus resultados apresentados nos próximos anos.

Os animais do grupo controle foram os únicos que apresentaram crescimento tumoral na primeira e segunda aplicação de células tumorais. Nosso estudo identificou um crescimento de tumor secundário em 73,3% dos animais do grupo controle. Como já discutido,

Kim et al.¹⁹⁶ identificou crescimento tumoral durante a segunda aplicação de células tumorais em 94,4% dos animais submetidos apenas a ressecção cirúrgica. Quando avaliamos o perfil da velocidade de crescimento tumoral na primeira e segunda inoculação de células Renca do grupo 1, observamos que a velocidade de crescimento foi menor na segunda aplicação do que na primeira. Apesar da ressecção cirúrgica isolada não ter sido suficiente para prevenir o crescimento de tumores secundários, a abordagem contribuiu para diminuir a taxa de crescimento desses tumores. Isso reforça a hipótese de que diferentes tratamentos podem induzir respostas imunológicas com potencial maior ou menor de alterar o desfecho clínico.

Reforçamos que este é um ensaio-piloto evidenciando a importância da resposta imunológica na evolução da neoplasia renal. Demonstramos que a utilização da imunoterapia isolada e a associação de imunoterapia com RF resultaram em um menor crescimento de tumor secundário. Dessa maneira dados pré-clínicos adicionais explorando o mecanismo dos efeitos desses tratamentos são necessários. Na prática clínica esses dados sugerem um possível benefício do uso de IC como tratamento adjuvante em pacientes com alto risco de recidiva tumoral após tratamento primário, cenário onde atualmente não há um tratamento bem estabelecido. Além disso, a utilização da RF como potencializador da resposta imune em pacientes em tratamento com imunoterápicos não é uma constância, apesar de alguns relatos de casos destacarem o efeito abscopal da associação do tratamento ablativo com imunoterapia. Acreditamos que ainda são necessários maiores estudos para compreendermos melhor esse efeito e sobretudo identificar qual paciente terá maior benefício com esse tipo de tratamento. Dessa maneira o presente estudo serve como estímulo a manutenção da linha de pesquisa para futuros estudos com desenho estatístico estruturado.

6 CONCLUSÕES

- Os animais submetidos ao tratamento do tumor primário com imunoterapia associado a RF, assim como a monoterapia com imunoterapia, apresentaram menor crescimento tumoral quando submetidos a segunda inoculação de células tumorais.
- A monoterapia com IC não foi capaz de alterar o crescimento do tumor primário.
- A terapia com RF associada a imunoterapia influenciou significativamente as taxas de crescimento do tumor primário.

7 REFERÊNCIAS

1. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma [Figure presented]. *Eur Urol*. 2019;75(1):74–84.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374–403.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
4. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. 2019. Disponível em: <https://bit.ly/3fQDmrC>. [2021 jan 13]
5. World Health Organization-WHO. International Agency for Research on Cancer. Globocan: cancer today. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. [2021 jan 13]
6. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):93–105.
7. Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol*. 2006;176(6):2353–8.
8. Shuch B, Vourganti S, Ricketts CJ, Middleton L, Peterson J, Merino MJ, et al. Defining early-onset kidney cancer: implications for germline and somatic mutation testing and clinical management. *J Clin Oncol*. 2014;32(5):431–7.
9. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 1996 Sep;335(12):865–75.
10. Lughezzani G, Jeldres C, Isbarn H, Perrotte P, Shariat SF, Sun M, et al. Tumor size is a determinant of the rate of stage t1 renal cell cancer synchronous metastasis. *J Urol*. 2009;182(4 SUPPL.):1287–93.
11. Hunt JD, Van Der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005;114(1):101–8.
12. Tahbaz R, Schmid M, Merseburger AS. Prevention of kidney cancer incidence and recurrence: Lifestyle, medication and nutrition. *Curr Opin Urol*. 2018;28(1):62–79.
13. Al-Bayati O, Hasan A, Pruthi D, Kaushik D, Liss MA. Systematic review of modifiable risk factors for kidney cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2019;37(6):359–71.

14. Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol*. 2009;16(5):432–43.
15. Skinner DG, Colvin RB, Vermillion CD, Pfister RC, Leadbetter WF. Diagnosis and management of renal cell carcinoma A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer*. 1971;28(5):1165–77.
16. Jayson M, Sanders H. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology*. 1998;51(2):203–5.
17. Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guillé F, Lobel B. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2003;44(2):226–32.
18. Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol*. 2002;7(4):135–40.
19. Sacco E, Pinto F, Sasso F, Racioppi M, Gulino G, Volpe A, et al. Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urol Int*. 2009;83(1):1–11.
20. Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG, Bui MHT, Han KR, Dorey FJ, et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: Implications for prognosis. *J Urol*. 2003;170(5):1742–6.
21. Delahunt B, Eble JN, Samaratunga H, Thunders M, Yaxley JW, Egevad L. Staging of renal cell carcinoma: current progress and potential advances. *Pathology*. 2021;53(1):120–8.
22. Flocks RH, Kadesky MC. Malignant neoplasms of the kidney: an analysis of 353 patients followed five years or more. *Trans Am Assoc Genitourin Surg*. 1957;49(2):105–10.
23. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol*. 1969;101(3):297–301.
24. Guinan P, Saffrin R, Stuhldreher D, Frank W, Rubenstein M. Renal cell carcinoma: comparison of the TNM and robson stage groupings. *J Surg Oncol*. 1995;59(3):186–9.
25. Nguyen CT, Campbell SC. Staging of renal cell carcinoma: past, present, and future. *Clin Genitourin Cancer*. 2006;5(3):190–7.
26. Ficarra V, Galfano A, Mancini M, Martignoni G, Artibani W. TNM staging system for renal-cell carcinoma: current status and future perspectives. *Lancet Oncol*. 2007;8(6):554–8.
27. Gettman MT, Blute ML, Spotts B, Bryant SC, Zincke H. Pathologic staging of renal cell carcinoma: significance of tumor classification with the 1997 TNM staging system. *Cancer*. 2001;91(2):354–61.
28. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;27(September 2008):v58–68.

29. Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the eighth edition of the tumor-node-metastasis staging classification for urologic cancers. *Eur Urol.* 2018;73(4):560–9.
30. August J, Permpongkosol S, Chan DY, Link RE, Jarrett TW, Kavoussi LR. Laparoscopic radical nephrectomy: long-term outcomes. *J Endourol.* 2005 Jul-Aug;19(6):628-33.
31. Van Poppel H, Da Pozzo L, Albrecht W, Matveev V, Bono A, Borkowski A, et al. A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2011;59(4):543–52.
32. Ng AM, Shah PH, Kavoussi LR. Laparoscopic partial nephrectomy: a narrative review and comparison with open and robotic partial nephrectomy. *J Endourol.* 2017;31(10):976–84.
33. Choi JE, You JH, Kim DK, Rha KH, Lee SH. Comparison of perioperative outcomes between robotic and laparoscopic partial nephrectomy: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol.* 2015;67(5):891–901.
34. Lane BR, Tjong HY, Campbell SC, Fergany AF, Weight CJ, Larson BT, et al. Management of the adrenal gland during partial nephrectomy. *J Urol.* 2009;181(6):2430–7. 7
35. Bekema HJ, Maclennan S, Imamura M, Lam TBL, Stewart F, Scott N, et al. Systematic review of adrenalectomy and lymph node dissection in locally advanced renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2013;64(5):799–810.
36. Blom JHM, van Poppel H, Maréchal JM, Jacqmin D, Schröder FH, de Prijck L, et al. Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Randomized Phase 3 Trial 30881. *Eur Urol.* 2009;55(1):28–34.
37. Lane BR, Abouassaly R, Gao T, Weight CJ, Hernandez A V., Larson BT, et al. Active treatment of localized renal tumors may not impact overall survival in patients aged 75 years or older. *Cancer.* 2010;116(13):3119–26.
38. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Five-year survival after surgical treatment for kidney cancer: A population-based competing risk analysis. *Cancer.* 2007;109(9):1763–8.
39. Volpe A, Panzarella T, Rendon RA, Haider MA, Kondylis FI, Jewett MAS. The natural history of incidentally detected small renal masses. *Cancer.* 2004;100(4):738–45.
40. Jewett MAS, Mattar K, Basiuk J, Morash CG, Pautler SE, Siemens DR, et al. Active surveillance of small renal masses: progression patterns of early stage kidney cancer. *Eur Urol.* 2011;60(1):39–44.

41. Smaldone MC, Kutikov A, Egleston BL, Canter DJ, Viterbo R, Chen DYT, et al. Small renal masses progressing to metastases under active surveillance: a systematic review and pooled analysis. *Cancer*. 2012;118(4):997–1006.
42. Mourão TC, Abreu D, Carvalhal GF, Gueglio G, Da Costa WH, Calsavara VF, et al. Small renal masses in Latin-American population: characteristics and prognostic factors for survival, recurrence and metastasis - a multi-institutional study from LARCG database. *BMC Urol*. 2020;20(1):1–9.
43. Breen DJ, Bryant TJ, Abbas A, Shepherd B, McGill N, Anderson JA, et al. Percutaneous cryoablation of renal tumours: outcomes from 171 tumours in 147 patients. *BJU Int*. 2013;112(6):758–65.
44. Zlotta AR, Raviv G, Wilschutz T, Peny MO, Van Gansbeke D, Schulman CC. Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) is a new modality of treatment of renal cancer: ex-vivo and in vivo experience. *Br J Urol*. 1997;80(SUPPL. 2):140.
45. Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR. Thermal ablation therapy for focal malignancy. *Am J Roentgenol*. 2000;174(2):323–31.
46. Wah TM. Image-guided ablation of renal cell carcinoma. *Clin Radiol*. 2017;72(8):636–44.
47. Xing M, Kokabi N, Zhang D, Ludwig JM, Kim HS. Comparative effectiveness of thermal ablation, surgical resection, and active surveillance for T1a renal cell carcinoma: a surveillance, epidemiology, and end results (SEER)–Medicare-linked population study. *Radiology*. 2018;288(1):81–90.
48. Abu-Ghanem Y, Fernández-Pello S, Bex A, Ljungberg B, Albiges L, Dabestani S, et al. Limitations of available studies prevent reliable comparison between tumour ablation and partial nephrectomy for patients with localised renal masses: a systematic review from the European Association of Urology Renal Cell Cancer Guideline Panel. *Eur Urol Oncol*. 2020;3(4):433–52.
49. Guazzoni G, Cestari A, Buffi N, Lughezzani G, Nava L, Cardone G, et al. Oncologic results of laparoscopic renal cryoablation for clinical T1a tumors: 8 years of experience in a single institution. *Urology*. 2010;76(3):624–9.
50. Larcher A, Fossati N, Mistretta F, Lughezzani G, Lista G, Dell’Oglio P, et al. Long-term oncologic outcomes of laparoscopic renal cryoablation as primary treatment for small renal masses. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2015;33(1):22.e1-22.e9.
51. Martinez Chanza N, Tripathi A, Harshman LC. Adjuvant therapy options in renal cell carcinoma: where do we stand? *Curr Treat Options Oncol*. 2019;20(5).
52. Massari F, Di Nunno V, Mollica V, Graham J, Gatto L, Heng D. Adjuvant tyrosine kinase inhibitors in treatment of renal cell carcinoma: a meta-analysis of available clinical Trials. *Clin Genitourin Cancer*. 2019;17(2):e339–44.

53. Rodríguez-Fernández IA, Rodríguez-Romo L, Hernandez-Barajas D, Gonzalez-Conchas GA, Verdines-Perez A, Templeton AJ, et al. Adjuvant radiation therapy after radical nephrectomy in patients with localized renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol Oncol.* 2019;2(4):448–55.
54. Atzpodien J, Schmitt E, Gertenbach U, Fornara P, Heynemann H, Maskow A, et al. Adjuvant treatment with interleukin-2- and interferon-alpha2a-based chemoimmunotherapy in renal cell carcinoma post tumour nephrectomy: results of a prospectively randomised Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *Br J Cancer.* 2005;92(5):843–6.
55. Clark JI, Atkins MB, Urba WJ, Creech S, Figlin RA, Dutcher JP, et al. Adjuvant high-dose bolus interleukin-2 for patients with high-risk renal cell carcinoma: a cytokine working group randomized trial. *J Clin Oncol.* 2003;21(16):3133–40.
56. Figlin BRA, Thompson JA, Bukowski RM, Vogelzang NJ, Novick AC, Lange P, et al. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 1999 Aug;17(8):2521-9.
57. Galligioni E, Quaia M, Merlo A, Carbone A, Spada A, Favaro D, et al. Adjuvant immunotherapy treatment of renal carcinoma patients with autologous tumor cells and bacillus Calmette-Guèrin: five-year results of a prospective randomized study. *Cancer.* 1996 Jun 15;77(12):2560-6.
58. Gross-Goupil M, Kwon TG, Eto M, Ye D, Miyake H, Seo SI, et al. Axitinib versus placebo as an adjuvant treatment of renal cell carcinoma: results from the phase III, randomized ATLAS trial. *Ann Oncol.* 2018;29(12):2371–8.
59. Motzer RJ, Haas NB, Donskov F, Gross-Goupil M, Varlamov S, Kopyltsov E, et al. Randomized phase III trial of adjuvant pazopanib versus placebo after nephrectomy in patients with localized or locally advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(35):3916–23.
60. Lenis AT, Donin NM, Johnson DC, Salmasi A, Drakaki A, Belldegrun A, et al. Adjuvant therapy for high risk localized kidney cancer: emerging evidence and future clinical trials. *J Urol.* 2018 Jan;199(1):43-52.
61. Salmasi A, Faiena I, Drakaki A, Pantuck AJ. Re: adjuvant sunitinib in high-risk renal-cell carcinoma after nephrectomy. *Eur Urol.* 2018;74(1):119–21.
62. Haas NB, Manola J, Dutcher JP, Flaherty KT, Uzzo RG, Atkins MB, et al. Adjuvant treatment for high-risk clear cell renal cancer: updated results of a high-risk subset of the ASSURE randomized trial. *JAMA Oncol.* 2017 Sep 1;3(9):1249–52.

63. Harshman LC, Xie W, Moreira RB, Bossé D, Ruiz Ares GJ, Sweeney CJ, et al. Evaluation of disease-free survival as an intermediate metric of overall survival in patients with localized renal cell carcinoma: A trial-level meta-analysis. *Cancer*. 2018;124(5):925–33.
64. Wiechno P, Kucharz J, Sadowska M, Michalski W, Sikora-Kupis B, Jonska-Gmyrek J, et al. Contemporary treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Med Oncol*. 2018;35(12):156.
65. Martini A, Fallara G, Pellegrino F, Cirulli GO, Larcher A, Necchi A, et al. Neoadjuvant and adjuvant immunotherapy in renal cell carcinoma. *World J Urol*. 2021 39(5):1369-1376.
66. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet*. 2009;373(9669):1119–32.
67. Flanigan RC, Campbell SC, Clark JI, Picken MM. Metastatic renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2003 Oct;4(5):385–90.
68. Motzer BRJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. 2017;17(8):2530–40.
69. Barata PC, Rini BI. Treatment of renal cell carcinoma: current status and future directions. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(6):507–24.
70. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005 Dec;353(23):2477–90.
71. Lalani AKA, McGregor BA, Albiges L, Choueiri TK, Motzer R, Powles T, et al. Systemic treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma in 2018: current paradigms, use of immunotherapy, and future directions. *Eur Urol*. 2019;75(1):100–10.
72. McDermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005;23(1):133–41.
73. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol*. 1995;13(3):688–96.
74. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Chang AE, Schwartzentruber DJ, et al. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(8):622–32.
75. Bellmunt J, Négrier S, Escudier B, Awada A, Aapro M. The medical treatment of metastatic renal cell cancer in the elderly: position paper of a SIOG Taskforce. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;69(1):64–72.
76. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(2):125–34.

77. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(22):3584–90.
78. Motzer RJ, Hutson TE, Olsen MR, Hudes GR, Burke JM, Edenfield WJ, et al. Randomized phase II trial of sunitinib on an intermittent versus continuous dosing schedule as first-line therapy for advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(12):1371–7.
79. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, et al. Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2013;369(8):722–31.
80. Rini BI, Escudier B, Tomczak P, Kaprin A, Szczyluk C, Hutson TE, et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011;378(9807):1931–9.
81. Motzer RJ, Escudier B, Tomczak P, Hutson TE, Michaelson MD, Negrier S, et al. Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):552–62.
82. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Mainwaring PN, Rini BI, Donskov F, et al. Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015 Nov 5;373(19):1814–23.
83. Motzer RJ, Hutson TE, Glen H, Michaelson MD, Molina A, Eisen T, et al. Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: a randomised, phase 2, open-label, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(15):1473–82.
84. Larkin JMG, Eisen T. Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;60(3):216–26.
85. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008;372(9637):449–56.
86. Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, Stadler WM, Vaena DA, Archer L, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206. *J Clin Oncol*. 2010;28(13):2137–43.
87. Hahn AW, Klaassen Z, Agarwal N, Haaland B, Esther J, Ye XY, et al. First-line treatment of metastatic renal cell carcinoma: a systematic review and network meta-analysis. *Eur Urol Oncol*. 2019;2(6):708–15.
88. Labriola MK, Batich KA, Zhu J, McNamara MA, Harrison MR, Armstrong AJ, et al. Immunotherapy is changing first-line treatment of metastatic renal-cell carcinoma. *clin genitourin cancer*. 2019;17(3):e513–21.

89. Brown LC, Desai K, Zhang T, Ornstein MC. The immunotherapy landscape in renal cell carcinoma. *BioDrugs*. 2020;34(6):733–48.
90. Bedke J, Albiges L, Capitanio U, Giles RH, Hora M, Lam TB, et al. Updated European Association of Urology guidelines on renal cell carcinoma: nivolumab plus cabozantinib joins immune checkpoint inhibition combination therapies for treatment-naïve metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2021;79(3):339–42.
91. Dizman N, Philip EJ, Pal SK. Genomic profiling in renal cell carcinoma. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(8):435–51.
92. Noe A, de Bruijn RE, Blank C, Horenblas S, Haanen J, Bex A. Comparison of pre-treatment MSKCC and IMDC prognostic risk models in patients with synchronous metastatic renal cell carcinoma treated in the era of targeted therapy. *World J Urol*. 2016;34(8):1067–72.
93. Heng DYC, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: Results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol*. 2009;27(34):5794–9.
94. Motzer BRJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-Alpha as a Comparative Treatment for Clinical. 2002;20(1):289–96.
95. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2010 update. *Eur Urol*. 2010 Sep;58(3):398-406.
96. Bhindi B, Abel EJ, Albiges L, Bensalah K, Boorjian SA, Daneshmand S, et al. Systematic Review of the Role of Cytoreductive Nephrectomy in the Targeted Therapy Era and Beyond: An Individualized Approach to Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2019;75(1):111–28.
97. Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, Van Poppel H, Crawford ED. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: A combined analysis. *J Urol*. 2004;171(3):1071–6.
98. Ljungberg B, Sundqvist P, Lindblad P, Kjellman A, Thorstenson A, Hellström M, et al. Survival advantage of upfront cytoreductive nephrectomy in patients with primary metastatic renal cell carcinoma compared with systemic and palliative treatments in a real-world setting. *Scand J Urol*. 2020;54(6):487–92.
99. Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Colas S, Beauval J-B, Bensalah K, et al. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;379(5):417–27.
100. Heng DYC, Wells JC, Rini BI, Beuselinck B, Lee JL, Knox JJ, et al. Cytoreductive nephrectomy in patients with synchronous metastases from renal cell carcinoma: Results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *Eur Urol*. 2014;66(4):704–10.

101. Bex A, Mulders P, Jewett M, Wagstaff J, Van Thienen J V., Blank CU, et al. Comparison of Immediate vs Deferred Cytoreductive Nephrectomy in Patients with Synchronous Metastatic Renal Cell Carcinoma Receiving Sunitinib: The SURTIME Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):164–70.
102. Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Chevreau C, Bensalah K, Geoffrois L, et al. Sunitinib Alone or After Nephrectomy for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Is There Still a Role for Cytoreductive Nephrectomy? *Eur Urol.* 2021 Jun 26; Epub ahead of print.
103. Gilbert N, Merseburger AS, Kramer M. [Symptomatic renal tumours in metastatic renal cell carcinoma - surgical options]. *Aktuelle Urol.* 2018 Sep;49(5):417–21.
104. Torrezini T, Athanazio DA. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. *Rev Bras Cancerol.* 2008;54(1):63–77.
105. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin Oncol Nurs.* 2019;35(5):150923.
106. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991–8.
107. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22(4):329–60.
108. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. *J Intern Med.* 2016;279(6):541–62.
109. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:235–71.
110. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331(6024):1565–70.
111. Strausberg RL. Tumor microenvironments, the immune system and cancer survival. *Genome Biol.* 2005;6(3):9–12.
112. Perut F, Cenni E, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Giunti A, Baldini N. Immunogenic properties of renal cell carcinoma and the pathogenesis of osteolytic bone metastases. *Int J Oncol.* 2009 May;34(5):1387–93. 1
113. Thurnher M, Radmayr C, Hobisch A, Böck G, Romani N, Bartcch G, et al. Tumor-infiltrating T lymphocytes from renal-cell carcinoma express B7-1 (CD80): T-Cell expansion by T-T cell co-stimulation. *Int J Cancer.* 1995;62(5):559–64.
114. Zhang S, Zhang E, Long J, Hu Z, Peng J, Liu L, et al. Immune infiltration in renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2019;110(5):1564–72.
115. Frankenberger B, Noessner E, Schendel DJ. Immune suppression in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(4):330–43.

116. Kellie S, Al-Mansour Z. Overview of the Immune System. *Micro- Nanotechnol Vaccine Dev.* 2017;357:63–81.
117. Powles T. Re: Nivolumab plus Ipilimumab Versus Sunitinib in Advanced Renal-cell Carcinoma. *Eur Urol.* 2018;74(5):679–80.
118. Díaz-Montero CM, Rini BI, Finke JH. The immunology of renal cell carcinoma. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(12):721–35.
119. Baine MK, Turcu G, Zito CR, Adeniran AJ, Camp RL, Chen L, et al. Characterization of tumor infiltrating lymphocytes in paired primary and metastatic renal cell carcinoma specimens. *Oncotarget.* 2015;6(28):24990–5002.
120. Chevrier S, Levine JH, Zanotelli VRT, Silina K, Schulz D, Bacac M, et al. An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell.* 2017;169(4):736–749.e18.
121. Kopecký O, Lukesová S, Vrobllová V, Vokurková D, Morávek P, Safránek H, et al. Phenotype analysis of tumour-infiltrating lymphocytes and lymphocytes in peripheral blood in patients with renal carcinoma. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2007;50(3):207–12.
122. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Front Immunol.* 2018;9(Aug):1–23.
123. Donskov F, Bennedsgaard KM, Von Der Maase H, Marcussen N, Fisker R, Jensen JJ, et al. Intratumoural and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with metastatic renal cell carcinoma undergoing interleukin-2 based immunotherapy: Association to objective response and survival. *Br J Cancer.* 2002;87(2):194–201.
124. Eckl J, Buchner A, Prinz PU, Riesenberger R, Siegert SI, Kammerer R, et al. Transcript signature predicts tissue NK cell content and defines renal cell carcinoma subgroups independent of TNM staging. *J Mol Med.* 2012;90(1):55–66.
125. Engblom C, Pfirschke C, Pittet MJ. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(7):447–62.
126. Toma M, Wehner R, Kloß A, Hübner L, Fodelianaki G, Erdmann K, et al. Accumulation of tolerogenic human 6-sulfo LacNAc dendritic cells in renal cell carcinoma is associated with poor prognosis. *Oncoimmunology.* 2015;4(6):1–14.
127. Toge H, Inagaki T, Kojimoto Y, Shinka T, Hara I. Angiogenesis in renal cell carcinoma: The role of tumor-associated macrophages: Original Article: Clinical Investigation. *Int J Urol.* 2009;16(10):801–7.
128. Roumenina LT, Daugan M V., Noe R, Petitprez F, Vano YA, Sanchez-Salas R, et al. Tumor cells hijack macrophage-produced complement C1q to promote tumor growth. Vol. 7, *Cancer Immunology Research.* 2019. 1091–1105 p.

129. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017;168(4):707–23.
130. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015;348(6230):56–61.
131. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 2015 Apr 13;27(4):450–61.
132. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252–64.
133. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov*. 2018;8(9):1069–86.
134. Khattry R, Auger JA, Griffin MD, Sharpe AH, Bluestone JA. Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J Immunol*. 1999;162(10):5784–91.
135. Paterson AM, Lovitch SB, Sage PT, Juneja VR, Lee Y, Trombley JD, et al. Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J Exp Med*. 2015;212(10):1603–21.
136. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887–95.
137. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):153–67.
138. McDermott DF, Drake CG, Sznol M, Choueiri TK, Powderly JD, Smith DC, et al. Survival, Durable Response, and Long-Term Safety in Patients With Previously Treated Advanced Renal Cell Carcinoma Receiving Nivolumab. *J Clin Oncol*. 2015 Jun;33(18):2013–20.
139. Haanen J, Robert C. Immune Checkpoint Inhibitors. *Prog tumor Res*. 2015;42:55–66.
140. Xu W, Atkins MB, McDermott DF. Checkpoint inhibitor immunotherapy in kidney cancer. *Nat Rev Urol*. 2020;17(3):137–50.
141. Mondlane ER, Abreu-Mendes P, Martins D, Cruz R, Mendes F. The role of immunotherapy in advanced renal cell carcinoma: Review. *Int Braz J Urol*. 2021 Feb 11;47(x):651–65.
142. Soares A, Monteiro FSM, Maluf FC, Bastos DA, Jardim DL, Sasse AD, et al. Advanced renal cell carcinoma (RCC) management: an expert panel recommendation from the Latin American Cooperative Oncology Group (LACOG) and the Latin American Renal Cancer Group (LARCG). *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020;146(7):1829–45.
143. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1803–13.

144. McDermott DF, Lee J-L, Szczylik C, Donskov F, Malik J, Alekseev BY, et al. Pembrolizumab monotherapy as first-line therapy in advanced clear cell renal cell carcinoma (accRCC): Results from cohort A of KEYNOTE-427. *J Clin Oncol*. 2018 May 20;36(15_suppl):4500–4500.
145. Albiges L, Tannir NM, Burotto M, McDermott D, Plimack ER, Barthélémy P, et al. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib for first-line treatment of advanced renal cell carcinoma: Extended 4-year follow-up of the phase III CheckMate 214 trial. *ESMO Open*. 2020;5(6):1–10.
146. Minguet J, Smith KH, Bramlage CP, Bramlage P. Targeted therapies for treatment of renal cell carcinoma: Recent advances and future perspectives. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;76(2):219–33.
147. Yang J, Yan J, Liu B. Targeting VEGF/VEGFR to modulate antitumor immunity. *Front Immunol*. 2018;9(May):1–9.
148. Ozao-Choy J, Ge M, Kao J, Wang GX, Meseck M, Sung M, et al. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res*. 2009;69(6):2514–22.
149. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(12):1116–27.
150. Powles T, Plimack ER, Soulières D, Waddell T, Stus V, Gafanov R, et al. Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib monotherapy as first-line treatment of advanced renal cell carcinoma (KEYNOTE-426): extended follow-up from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(12):1563–73.
151. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Escudier B, Bourlon MT, Zurawski B, et al. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021 Mar 4;384(9):829–41.
152. Motzer R, Alekseev B, Rha S-Y, Porta C, Eto M, Powles T, et al. Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021;384(14):1289–300.
153. Choueiri TK, Motzer RJ, Rini BI, Haanen J, Campbell MT, Venugopal B, et al. Updated efficacy results from the JAVELIN Renal 101 trial: first-line avelumab plus axitinib versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2020;31(8):1030–9.
154. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(12):1103–15.
155. Rini BI, Powles T, Atkins MB, Escudier B, McDermott DF, Suarez C, et al. Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet*. 2019;393(10189):2404–15.

156. Fernández-Pello S, Hofmann F, Tahbaz R, Marconi L, Lam TB, Albiges L, et al. A Systematic Review and Meta-analysis Comparing the Effectiveness and Adverse Effects of Different Systemic Treatments for Non-clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2017;71(3):426–36.
157. McDermott DF, Lee J-L, Szczylik C, Donskov F, Malik J, Alekseev BY, et al. Pembrolizumab monotherapy as first-line therapy in advanced clear cell renal cell carcinoma (accRCC): Results from cohort A of KEYNOTE-427. *J Clin Oncol*. 2018 May 20;36(15_suppl):4500–4500.
158. Deleuze A, Saout J, Dugay F, Peyronnet B, Mathieu R, Verhoest G, et al. Immunotherapy in renal cell carcinoma: The future is now. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7).
159. Longo V, Brunetti O, Azzariti A, Galetta D, Nardulli P, Leonetti F, et al. Strategies to improve cancer immune checkpoint inhibitors efficacy, other than abscopal effect: A systematic review. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4):1–19.
160. Demaria S, Formenti SC. The abscopal effect 67 years later: from a side story to center stage. *Br J Radiol*. 2020 May 1;93(1109):20200042.
161. Yilmaz MT, Elmali A, Yazici G. Abscopal Effect, From Myth to Reality: From Radiation Oncologists' Perspective. *Cureus*. 2019;11(1):9–13.
162. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, et al. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N Engl J Med*. 2012 Mar;366(10):925–31.
163. De Meerleer G, Khoo V, Escudier B, Joniau S, Bossi A, Ost P, et al. Radiotherapy for renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):170–7.
164. Xia Q-Y, Wang Z, Chen N, Gan H-L, Teng X-D, Shi S-S, et al. Xp11.2 translocation renal cell carcinoma with NONO-TFE3 gene fusion: morphology, prognosis, and potential pitfall in detecting TFE3 gene rearrangement. *Mod Pathol*. 2016 Dec;
165. Kroeze SGC, van Melick HHE, Nijkamp MW, Kruse FK, Kruijssen LWJ, van Diest PJ, et al. Incomplete thermal ablation stimulates proliferation of residual renal carcinoma cells in a translational murine model. *BJU Int*. 2012 Sep;110(6 Pt B):E281-6.
166. Haanen JBAG. Converting Cold into Hot Tumors by Combining Immunotherapies. *Cell*. 2017;170(6):1055–6.
167. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):313–22.
168. Ashrafizadeh M, Farhood B, Elejo Musa A, Taeb S, Rezaeyan A, Najafi M. Abscopal effect in radioimmunotherapy. *Int Immunopharmacol*. 2020;85:106663.
169. Solanki AA, Bossi A, Efstathiou JA, Lock D, Mondini M, Ramapriyan R, et al. Combining Immunotherapy with Radiotherapy for the Treatment of Genitourinary Malignancies. *Eur Urol Oncol*. 2019;2(1):79–87.

170. Park B, Yee C, Lee K-M. The effect of radiation on the immune response to cancers. *Int J Mol Sci*. 2014 Jan;15(1):927–43.
171. Blake SJP, Ching ALH, Kenna TJ, Galea R, Large J, Yagita H, et al. Blockade of PD-1/PD-L1 promotes adoptive T-cell immunotherapy in a tolerogenic environment. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119483.
172. Takaki H, Cornelis F, Kako Y, Kobayashi K, Kamikonya N, Yamakado K. Thermal ablation and immunomodulation: From preclinical experiments to clinical trials. *Diagn Interv Imaging*. 2017;98(9):651–9.
173. Chu KF, Dupuy DE. Thermal ablation of tumours: Biological mechanisms and advances in therapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(3):199–208.
174. Mehta A, Oklu R, Sheth RA. Thermal Ablative Therapies and Immune Checkpoint Modulation: Can Locoregional Approaches Effect a Systemic Response? *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:9251375.
175. Rao P, Escudier B, De Baere T. Spontaneous regression of multiple pulmonary metastases after radiofrequency ablation of a single metastasis. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2011;34(2):424–30.
176. Aarts BM, Klompenhouwer EG, Rice SL, Imani F, Baetens T, Bex A, et al. Cryoablation and immunotherapy: an overview of evidence on its synergy. *Insights Imaging*. 2019;10(1).
177. Matin SF, Sharma P, Gill IS, Tannenbaum C, Hobart MG, Novick AC, et al. Immunological response to renal cryoablation in an in vivo orthotopic renal cell carcinoma murine model. *J Urol*. 2010 Jan;183(1):333–8.
178. Kroeze SGC, Daenen LGM, Nijkamp MW, Roodhart JML, de Gast GC, Bosch JLHR, et al. Radio frequency ablation combined with interleukin-2 induces an antitumor immune response to renal cell carcinoma in a murine model. *J Urol*. 2012 Aug;188(2):607–14.
179. Tsimafeyeu I, Zart JS, Chung B. Cytoreductive radiofrequency ablation in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) with small primary tumours treated with sunitinib or interferon- α . *BJU Int*. 2013 Jul;112(1):32–8.
180. Belcaid Z, Phallen JA, Zeng J, See AP, Mathios D, Gottschalk C, et al. Focal radiation therapy combined with 4-1BB activation and CTLA-4 blockade yields long-term survival and a protective antigen-specific memory response in a murine glioma model. *PLoS One*. 2014;9(7):e0101764.
181. Shi L, Chen L, Wu C, Zhu Y, Xu B, Zheng X, et al. PD-1 Blockade Boosts Radiofrequency Ablation-Elicited Adaptive Immune Responses against Tumor. *Clin Cancer Res*. 2016 Mar;22(5):1173–84.
182. Zeng J, See AP, Phallen J, Jackson CM, Belcaid Z, Ruzevick J, et al. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013 Jun;86(2):343–9.

183. Hakimé A, Hines-Peralta A, Peddi H, Atkins MB, Sukhatme VP, Signoretti S, et al. Combination of radiofrequency ablation with antiangiogenic therapy for tumor ablation efficacy: study in mice. *Radiology*. 2007;244(2):464–70.
184. Zitvogel L, Pitt JM, Daillère R, Smyth MJ, Kroemer G. Mouse models in oncoimmunology. *Nat Rev Cancer*. 2016 Dec;16(12):759–73.
185. Lechner MG, Karimi SS, Barry-Holson K, Angell TE, Murphy KA, Church CH, et al. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J Immunother*. 2013;36(9):477–89.
186. Hirayama Y, Gi M, Yamano S, Tachibana H, Okuno T, Tamada S, et al. Anti-PD-L1 treatment enhances antitumor effect of everolimus in a mouse model of renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2016 Dec;107(12):1736–44.
187. Pilon-Thomas S, Mackay A, Vohra N, Mulé JJ. Blockade of programmed death ligand 1 enhances the therapeutic efficacy of combination immunotherapy against melanoma. *J Immunol*. 2010 Apr;184(7):3442–9.
188. Shindo Y, Yoshimura K, Kuramasu A, Watanabe Y, Ito H, Kondo T, et al. Combination immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. *Anticancer Res*. 2015 Jan;35(1):129–36.
189. Sanchez-Ortiz RF, Tannir N, Ahrar K, Wood CG. Spontaneous regression of pulmonary metastases from renal cell carcinoma after radio frequency ablation of the primary tumor: An in situ tumor vaccine? *J Urol*. 2003;170(1):178–9.
190. Kim H, Byung KP, Chan KK. Spontaneous regression of pulmonary and adrenal metastases following percutaneous radiofrequency ablation of a recurrent renal cell carcinoma. *Korean J Radiol*. 2008;9(5):470–2.
191. Mazzola CR, Ribatti D. Animal models of spontaneous renal carcinoma: A possible rebirth? *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2020;38(4):174–83.
192. Zhang X, Niedermann G. Abscopal Effects With Hypofractionated Schedules Extending Into the Effector Phase of the Tumor-Specific T-Cell Response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018;101(1):63–73.
193. Aggen DH, Ager CR, Obradovic AZ, Chowdhury N, Ghasemzadeh A, Mao W, et al. Blocking IL1 Beta Promotes Tumor Regression and Remodeling of the Myeloid Compartment in a Renal Cell Carcinoma Model: Multidimensional Analyses. *Clin Cancer Res*. 2021 Jan 15;27(2):608–21.
194. Zhang X, Shi X, Li J, Hu Z, Gao J, Wu S, et al. Combination immunotherapy with interleukin-2 surface-modified tumor cell vaccine and programmed death receptor-1 blockade against renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2019;110(1):31–9.

195. O'Shaughnessy MJ, Murray KS, La Rosa SP, Budhu S, Merghoub T, Somma A, et al. Systemic antitumor immunity by PD-1/PD-L1 inhibition is potentiated by vascular-targeted photodynamic therapy of primary tumors. *Clin Cancer Res.* 2018;24(3):592–9.
196. Kim HK, Pyun JH, Cho S, Kang SG, Lee JG, Kim JJ, et al. Tumor-specific immunity induced by cryoablation in a murine renal cell carcinoma model. *Korean J Urol.* 2014;55(12):834–40.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética do uso de Animais-CEUA



A.C. Camargo
Cancer Center

CEUA/FAP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE

São Paulo, 12 de Novembro de 2018.

Ao
Dr. Tiago Góss dos Santos

Ref. Projeto de Pesquisa nº 078/18

Título: “Estudo sobre terapia de ablação por radiofrequência combinada com inibidores de checkpoint do sistema imune em um modelo murino de carcinoma de células renais”

Prezado Doutor,

A solicitação de inclusão do aluno Rafael Ribeiro Meduna ao referido projeto, datada de 26/10/2018, foi apreciada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antônio Prudente - A.C. Camargo Cancer Center, em reunião do dia 09 de novembro de 2018, tendo sido aprovada.

Atenciosamente,

Dra. Glaucia Noeli Maroso Hajj
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais