

RENATO NARDI PEDRO

USO DA NANOPARTÍCULA DE OURO LIGADA A MOLÉCULAS DE FATOR ALFA DE
NECROSE TUMORAL COMO ADJUVANTE DA TERMOABLAÇÃO POR
RADIOFREQUÊNCIA DE TUMORES RENAIIS: MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL.

Tese de doutorado

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lopes de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigues Netto Junior

UNICAMP 2010

RENATO NARDI PEDRO

USO DA NANOPARTÍCULA DE OURO LIGADA A MOLÉCULAS DE FATOR ALFA DE
NECROSE TUMORAL COMO ADJUVANTE DA TERMOABLAÇÃO POR
RADIOFREQUÊNCIA DE TUMORES RENAIIS: MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL.

Tese de Doutorado apresentada à pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do Título de Doutor em
Ciências, área de Concentração em Fisiopatologia
Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lopes de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigues Netto Junior

UNICAMP 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Pedro, Renato Nardi

P344u Uso da nanopartícula de ouro ligada a moléculas de fator alfa de necrose tumoral como adjuvante da termoablação por radiofrequência de tumores renais: modelo experimental / Renato Nardi Pedro. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores : Marcelo Lopes de Lima; Nelson Rodrigues Netto Junior

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Radiofrequência. 2. Tumor. 3. Rim. 4. Câncer. 5. Fator de necrose tumoral. I. Lima, Marcelo Lopes de. II. Rodrigues Netto Junior, Nelson. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Use of tumor necrosis factor alpha-coated nanoparticles to enhance radiofrequency ablation in a translational model of renal tumor

Keywords: • Radiofrequency, Tumors, Kidney, Cancer, Tumor necrosis factor

Titulação: Doutor em Ciências da Cirurgia

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Banca examinadora:

Profº. Drº. Marcelo Lopes de Lima

Profº. Drº. Antônio Gugliotta

Profº. Drº. José Roberto Colombo Junior

Profº. Drº. Ricardo Destro Saade

Profº. Drº. Carlos Arturo Levi D'Ancona

Data da defesa: 06-10-2010

Banca Examinadora da Defesa de Doutorado

Renato Nardi Pedro

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lopes de Lima

Membros:

1. Prof. Dr. Marcelo Lopes de Lima -

2. Prof. Dr. Antonio Gugliotta -

3. Prof. Dr. Jose Roberto Colombo Junior -

2. Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona -

3. Prof. Dr. Ricardo Destro Saade -

The image shows five handwritten signatures in blue ink, each corresponding to a member of the defense committee listed to the left. The signatures are: 1. Marcelo Lopes de Lima, 2. Antonio Gugliotta, 3. Jose Roberto Colombo Junior, 2. Carlos Arturo Levi D'Ancona, and 3. Ricardo Destro Saade.

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/10/2010

Dedico este trabalho...

à minha família, pelos constantes ensinamentos e onde encontro apoio e motivação sinceros e reais; em especial a minha esposa Cinira e filho Gabriel sempre ao meu lado me fazendo sorrir.

"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

Agradecimentos

Durante a realização deste estudo tive o privilégio de conhecer e trabalhar com pessoas de diferentes culturas, raças e formações. Todos, porém, respeitavam-se mutuamente e cumpriam de maneira objetiva e determinada suas metas e papéis, tornando fácil e descomplicado os “problemas” mais complexos por mim classificados; este período foi uma fonte inesgotável de lições, experiência profissional e pessoal, que levarei sempre comigo.

Ao Dr. J. Kyle Anderson, pela confiança em mim depositada, desde o primeiro encontro no saguão do Hospital dos Veteranos de Minneapolis, pela simplicidade e honestidade em lidar sobre assuntos de qualquer natureza.

Ao Dr. David DeLong, pelos ensinamentos científicos no manuseio dos equipamentos do biotério, pela assistência ininterrupta e pela paciência.

A Leslie Dickinson, excelente veterinária, sempre solícita e fiel parceira de operações.

Ao Professor Nelson Rodrigues Netto Junior por nunca ter posto obstáculos em minhas jornadas, e por se mostrar ilimitadamente presente em prol de meu desenvolvimento científico e profissional. Por representar um modelo a ser seguido.

Ao Professor Marcelo Lopes de Lima, pelos auxílios indispensáveis e sempre oportunos.

Aos grandes amigos Bryan Hinck, Kishore TekkeAdyat, Tim Holden, Richard Beddingfield, Sam Kinley, Beth e Joseph Arkonor, que me ajudaram enormemente nas atividades deste estudo.

Ao Professor e chefe Interino da Universidade de Minnesota Eduardo Fernandes, um companheiro e instrutor, sempre dividindo sua experiência e me mostrando o rumo certo.

Ao Professor Manoj Monga, eterno amigo e tutor, detentor de personalidade única e incomparável; exímio cirurgião, respeitado profissional, cientista, médico, artista e jogador de Hockey.

Aos meus pais, por terem me ensinado a ter coragem e me proporcionado todas as condições para desfrutar as experiências de vida até hoje vividas.

A minha família, por tudo!

Resumo

O tratamento definitivo das massas renais malignas é primordialmente cirúrgico, sendo a nefrectomia radical eleita por muitos anos a cirurgia padrão para o tratamento do câncer renal localizado. Entretanto, com o envelhecimento populacional, maiores são as preocupações em se manter a capacidade funcional dos órgãos e sistemas do corpo humano. Portanto, a necessidade de se preservar tecido renal sadio durante o tratamento do câncer renal localizado, com auxílio de cirurgias parciais poupadoras de néfrons, se tornou imperativa. O tratamento de lesões renais sólidas pequenas passou a ter diferentes formas de abordagem, que variam desde técnicas de termoablação percutânea ou laparoscópica, nefrectomia parcial laparoscópica e aberta à até tradicional nefrectomia radical aberta. O uso de modalidades de tratamento cirúrgico com mínimo grau de agressão passou a ganhar atenção, devido à rápida recuperação do paciente, ao menor risco de complicações cirúrgicas e aos bons resultados oncológicos. Ablação por radiofrequência (ARF) tem se mostrado um meio eficiente no tratamento de tumores renais pequenos e exofíticos. Atualmente, sua indicação é restrita a lesões de até 4 cm. O presente estudo foi montado para avaliar o uso conjunto da nanopartícula de ouro e fator alfa de necrose tumoral (TNF alfa) à ARF no tratamento de um modelo experimental de tumor renal.

Materiais e Métodos

Trinta e sete coelhos brancos da raça New Zealand tiveram implantados em seus rins, através de uma laparotomia, um fragmento de 1 mm³ de tumor VX-2. Após 14 dias do implante, quando seus rins haviam desenvolvido uma lesão tumoral sólida menor que 1 cm, os animais foram divididos em 3 grupos de 10 e 1 grupo de 7 integrantes (sham) de acordo com o tratamento selecionado para o tumor renal focal: 1) Nanopartícula com TNF alfa; 2) Ablação por radiofrequência; 3) Nanopartícula com TNF alfa seguido de Ablação por radiofrequência; 4) Grupo sham. Todos os animais foram submetidos a mesma cronologia de tratamento, composta por 2 laparotomias e eutanásia. Os grupos tratados com as nanopartículas de ouro com fator alfa de necrose tumoral isolada ou complementarmente, as receberam 4 horas antes do procedimento cirúrgico na dose de 200 µm/Kg. A análise de resultados foi realizada com medidas macroscópicas e microscópicas do volume da área de ablação ou tumoral, segundo a fórmula do

volume de uma elipsóide. Avaliação estatística foi realizada com Teste *T Student*, sendo considerado significativo $p < 0.05$.

Resultados

O grupo que recebeu a nanopartícula com fator alfa de necrose tumoral e depois foi submetido à ARF apresentou maior zona de morte celular completa quando comparado ao grupo tratado somente com ablação por radiofrequência (0.30 ± 0.07 vs 0.23 ± 0.03 mL, $P = .03$). A zona de transição foi menor no grupo que recebeu a nanopartícula com fator alfa de necrose tumoral e ablação por radiofrequência quando comparada ao grupo tratado somente com ablação por radiofrequência (0.08 ± 0.02 vs 0.13 ± 0.05 mL, $P = .01$).

Conclusão

O presente estudo demonstrou que o uso da nanopartícula de ouro com TNF alfa sensibiliza o insulto térmico sofrido por tumores sólidos decorrentes da ablação por radiofrequência.

Abstract

Radical nephrectomy has long been considered as gold standard treatment for localized renal tumors. However due to an increase in life expectation, organ sparing surgeries have emerged with the purpose of preserving as much healthy tissue as possible. Therefore, nephron sparing surgeries have become another valid option for localized renal tumors. There are different modalities of nephron sparing procedures, including open partial nephrectomy, laparoscopic nephrectomy and thermoablative procedures. The later is associated with less morbidity and fast patient recovery. Radiofrequency ablation (RFA) is a well-known thermoablative procedure and it has been most effective when the tumors are small, exophytic, and away from vital structures. The present study was designed to analyze the adjuvant use of gold nanoparticle with tumor necrosis factor alpha prior to radiofrequency ablation in a translational model of localized renal tumor.

Material and Methods

A total of 37 New Zealand White rabbits had VX-2 tumors implanted into their kidneys; they were allowed to grow for 14 days, when a tumor mass of less than 1 cm could be detected. The animals were then split into 3 treatment groups of 10 rabbits each and a sham group of 7 rabbits as follows: (1) Tumor necrosis factor alpha plus nanoparticle, (2) Radiofrequency ablation, (3) Tumor necrosis factor alpha nanoparticle (200 $\mu\text{m}/\text{Kg}$) followed 4 hours later by radiofrequency ablation. All groups were subjected to the same milestones of the experiment which was comprised of 2 laparotomies and sacrifice. Gross and microscopic measurements of the ablation size as well as histological analysis using hematoxylin and eosin staining were performed to determine the effect of TNF alpha nanoparticle on the ablation. Statistical analysis was performed with Student's T test, considering $p < 0.05$ as significant.

Results

The RFA plus TNF alpha nanoparticle group had a larger zone of complete cell death than the RFA-only group (0.30 ± 0.07 vs 0.23 ± 0.03 mL, $P=0.03$). The zone of partially ablated tissue was

smaller in the RFA plus TNF alpha nanoparticle group than in the RFA-only group (0.08 ± 0.02 vs 0.13 ± 0.05 mL, $P = .01$).

Conclusions

We have demonstrated the efficacy of TNF alpha nanoparticle in enhancing RFA in a translational kidney tumor model. The potential usage of TNF alpha nanoparticle to improve RFA of renal cell carcinoma merits further study.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema ilustrativo representando as áreas decorrentes da ARF.....	21
Figura 2: Esquema ilustrativo da ARF de tumores renais.....	24
Figura 3: Nanopartícula de Ouro com TNF alfa.....	27
Figura 4: Objetivo do uso de um adjuvante molecular à ARF.....	29

Lista de Abreviaturas

- TNF: *tumor necrosis factor*
- TNF alfa: fator alfa de necrose tumoral
- PEG: polietilenoglicol
- ARF: ablação por radiofrequência
- μm : nanômetro
- cm: centímetros

Sumário

Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	16
1.1 Termoablação de tumores renais.....	19
1.1.1 Ablação por radiofrequência.....	19
1.1.2 Fatores Contribuintes para formação da zona de transição.....	22
1.2 Nanopartículas.....	25
1.2.1 Nanopartícula de ouro e fator alfa de necrose tumoral.....	26
1.3 Associação da Nanopartícula de ouro com TNF alfa e ARF.....	28
2. Objetivo.....	30
3. Publicação.....	31
4. Discussão.....	36
5. Conclusão.....	43
6. Bibliografia.....	44

1. Introdução

O tumor renal foi primeiramente descrito por Konig em 1825 (1), época em que as nefrectomias começaram a ser feitas, proporcionando aos patologistas grande fonte de material para estudo sobre enfermidades renais (2).

Atualmente, o câncer renal corresponde a 3% das neoplasias malignas do adulto, e está entre as dez neoplasias mais freqüentes entre homens e mulheres. Segundo dados da Sociedade Americana de Câncer, publicados em 2009 (3), o número de casos novos/ano estimados nos Estados Unidos é de 57.760 (35.430 em homens e 22.330 em mulheres); e cerca de 12.980 americanos morrerão desta doença a cada ano. Além disso, a incidência desta neoplasia está aumentando 3% ao ano e, é importante destacar, já em 2001 o número mundial de mortes decorrentes do câncer renal ao ano excedia 100.000 (4). Esta ascensão do número de casos de câncer renal se explica, em parte, pelos métodos diagnósticos de imagem mais eficientes (5) e, também, pelo consumo de alimentos industrializados ricos em gorduras, pelo tabagismo e, por fim, pelo envelhecimento populacional (6).

Caracteristicamente, o tumor renal não apresenta sintomas na fase inicial. A tríade clássica de dor em flanco, hematúria e massa palpável está presente em apenas 10% dos pacientes e se relaciona com estágios mais avançados da doença. Além da característica de crescimento silencioso, o tumor renal, quando sintomático, manifesta situações clínicas diversas, obscurecendo e retardando ainda mais seu diagnóstico (7).

Os diferentes estágios do tumor renal relacionam-se ao seu tamanho assim como invasão de órgãos adjacentes, comprometimento linfonodal e de órgãos distantes (8). O tratamento é

então determinado de acordo com o estágio da doença quando diagnosticada. Tumores renais em estágios avançados, não mais restritos ao rim, apresentam resposta terapêutica mínima, pois são resistentes a quimioterápicos e pouco responsivos a imunoterápicos (9,10); nestes casos, a cirurgia passa a ter papel paliativo e não mais curativo, expondo o paciente a prognósticos reservados. Estas características tornam crucial o diagnóstico precoce do tumor renal, visando a detecção e tratamento das lesões ainda restritas ao rim, preferencialmente de pequeno volume.

O tratamento definitivo das massas renais malignas é primordialmente cirúrgico, sendo a nefrectomia radical eleita por muitos anos a cirurgia padrão para o tratamento do câncer renal localizado (11). Esta cirurgia foi inicialmente descrita em 1963 por Robson (12), que orientou a remoção não só do rim comprometido como de toda fascia de Gerota, adrenal e linfonodos hilares e justo-aórticos ipsilaterais. Nestes casos, muitos néfrons sadios seriam desnecessariamente eliminados com o tratamento padrão radical e, com o envelhecimento populacional, maiores são as preocupações em se manter a capacidade funcional dos órgãos e sistemas do corpo humano. Portanto, a necessidade de se preservar tecido renal sadio durante o tratamento do câncer renal localizado, com auxílio de cirurgias parciais poupadoras de néfrons, se tornou imperativa. Surgiram, então, as cirurgias de ressecção parcial dos rins, denominadas nefrectomias parciais (13). A nefrectomia parcial compreende a retirada exclusiva da área da lesão renal juntamente com a parte da Gerota circunjacente, respeitando uma margem de segurança mínima e poupando ao máximo, o tecido renal normal. Esta forma de tratamento pode ser realizada por via aberta tradicional ou por via laparoscópica. Ambas reproduzem os mesmos passos cirúrgicos nos quais a dissecação minuciosa dos vasos renais e da massa tumoral são fundamentais para controle oncológico seguro, poupando parênquima renal sadio (14,15). Recentemente, a nefrectomia parcial mostrou-se eficiente no controle oncológico de lesões renais

focais, já que os resultados cirúrgicos e sobrevida desta modalidade foram equivalentes ao tratamento radical (14,15,16,17,18). Devido à longa curva de aprendizado e à complexidade de reprodução desta modalidade de tratamento, uma tendência surgiu em direção a meios menos complexos de tratamento de lesões renais focais (16).

A bioengenharia associou-se à medicina e implementou tecnologia na área cirúrgica, gerando avanços significativos em técnicas e modalidades de tratamento (17). Foi então, consolidado o conceito de cirurgia minimamente invasiva.

O tratamento de lesões renais sólidas pequenas passou a ter diferentes formas de abordagem, que variam desde técnicas de termoablação percutânea ou laparoscópica, nefrectomia parcial laparoscópica e aberta à até tradicional nefrectomia radical aberta (17,18). O uso de modalidades de tratamento cirúrgico com mínimo grau de agressão passou a ganhar atenção, devido à rápida recuperação do paciente, ao menor risco de complicações cirúrgicas e aos bons resultados oncológicos (17). As nefrectomias radicais por lombotomia tornaram-se então obsoletas e restritas a casos complexos, a via laparoscópica fortaleceu-se, e técnicas ainda menos invasivas passaram a se destacar no armamentário contra o câncer renal localizado (18).

É de especial interesse a ablação térmica de lesões sólidas renais, a termoterapia, onde energia térmica (calor ou frio) é aplicada exclusivamente a uma área tecidual causando morte celular focal. A necessidade de dissecação e exérese do tumor torna-se desnecessária, o que diminui o grau de agressão tecidual, a complexidade e tempo cirúrgico, minimizando riscos de sangramento e apressando a recuperação do paciente (18).

1.1 Termoablação de tumores renais

Tumores renais pequenos são alvos relativamente fáceis para ablação térmica, por serem usualmente esféricos, bem delimitados e circundados por tecido normal e gordura peri-renal. A superfície renal é amplamente acessível independente da via cirúrgica (laparoscópica, aberta ou percutânea), o que torna ainda mais atrativo o desenvolvimento de técnicas minimamente invasivas para o tratamento de massas renais localizadas. Por outro lado, a termoablação de tumores renais enfrenta um obstáculo significativo, fruto da hipervascularização e da presença de calibrosos vasos sanguíneos renais que funcionam como dreno (dissipador) da energia térmica, podendo levar à falha do tratamento oncológico (19,20). Desta maneira somente terapias capazes de causar morte celular instantânea ganharam aceitação no tratamento termoablativo de lesões focais renais. Dentre elas destaca-se a ablação por radiofrequência (ARF).

1.1.1 Ablação por radiofrequência

O emprego de calor a um tecido alvo é conseguido pela técnica de ARF. Esta modalidade terapêutica foi inicialmente aplicada em 1980 para ablação de feixes de condução aberrantes cardíacos e lesões endometriais sangrantes (21,22). No final da década de 1990 foi publicado o uso da ARF no tratamento de lesões renais sólidas focais, com sucesso (23,24).

Tecnicamente, esta modalidade de tratamento aplica uma corrente elétrica alternada de alta frequência (maior que 400.000 Hz) que induz excitação iônica, gerando forças friccionais agitação molecular e, por conseguinte, calor. O aumento de temperatura é diretamente proporcional à intensidade de corrente elétrica aplicada ao tecido, e quando atinge valores maiores que 45 graus causa desidratação, desnaturação progressiva das proteínas celulares, lise

das membranas e finalmente morte celular (25,26). Temperaturas maiores que 60 graus causam morte celular instantânea (26).

A área total da lesão térmica resultante da ARF é limitada pela desidratação tecidual, que restringe à propagação de energia de célula a célula por aumentar a impedância tecidual, que por sua vez, atenua a agitação iônica, e, portanto, circunscreve a ação deletéria do calor a uma área alvo (27).

Histologicamente a morte celular decorrente da ARF é caracterizada por necrose coagulativa, cuja a estrutura celular está mantida, com citoplasma eosinofílico, dilatação de vasos sanguíneos e alongamento nuclear. Todas as lesões térmicas originadas pela ARF reproduzem este padrão histológico após 24-48 horas do insulto térmico (28).

A corrente elétrica é transmitida ao tecido alvo através da introdução de uma agulha conectada a uma fonte emissora de energia elétrica alternada de alta frequência. Esta agulha apresenta em sua extremidade quatro a oito hastes tipo ferrões que se estendem, quando acionadas pelo cirurgião, ao tecido alvo e nele se fixam; permitindo a dissipação de energia. A área proximal à agulha sofrerá maior a agitação celular e, portanto, maiores serão as temperaturas atingidas; dessa forma, ao afastar-se dela menor efeito térmico será sentido, delimitando zonas diferentes de injúria térmica (28,29). Estas zonas se reproduzem em todas as lesões térmicas causadas em órgãos sólidos de organismos vivos, e são facilmente identificadas macro e microscopicamente. As zonas resultantes da ARF são classificadas em:

a) zona de morte celular completa (zona central),

b) zona transição ou zona de morte celular incompleta, onde células viáveis passam a ser identificadas em permeio de células mortas (zona mais periférica a agulha).

Após esta última camada encontram-se células vivas de tecido circunjacente a injúria térmica, que não sofreram danos. Denomina-se área total de ablação a somatória das zonas **a** e **b** descritas anteriormente. (figura 1)

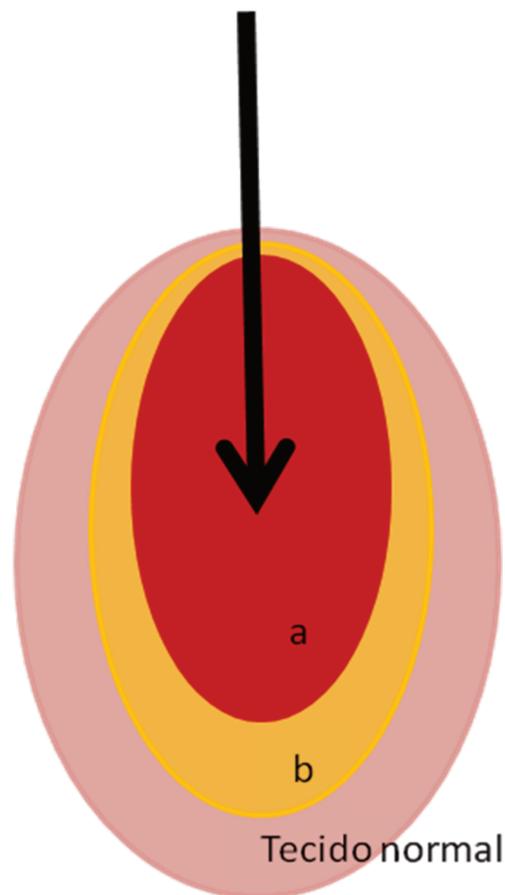


Figura 1: Esquema ilustrativo representando as áreas decorrentes da ARF; a) área central, representada por morte celular completa, b) área periférica ou de transição, células vivas são encontradas em permeio à morte celular. A soma de a + b corresponde a área total da lesão térmica.

Conceitualmente, a zona de transição é responsável pela falha do tratamento de ARF, pois células neoplásicas periféricas a localização da agulha de radiofrequência podem resistir à injúria térmica e provocar recidiva tumoral. Já a área central da ARF, onde há morte celular completa e homogênea, garante o tratamento oncológicamente desejável; pois toda célula contida nesta área sofrerá dano irreversível e fatal.

1.1.2 Fatores contribuintes na formação da zona de transição.

Sabidamente, a periferia da área total de ablação terá menor temperatura, podendo não atingir o mínimo necessário a causar dano celular irreversível; criando uma região contendo células mortas pelo calor e outras viáveis que resistiram à injúria térmica. Além da distância à agulha de radiofrequência, outros fatores contribuem com a perda de calor nesta área; importando sobremaneira na gênese e na dimensão da zona de transição.

Destaca-se, inicialmente, o efeito da circulação sanguínea presente na área alvo. O fluxo ininterrupto de sangue cria um mecanismo capaz de trocar calor com a área exposta a diferentes temperaturas. Este fenômeno é chamado de efeito de drenagem de calor (*heat sink*) (19). Os vasos sanguíneos tangenciais a termoablação conduzem parte da energia térmica para longe da área alvo, evitando que danos celulares irreversíveis ocorram. Quanto menor energia aplicada mais significativo será o efeito deste fenômeno no tecido alvo. Da mesma maneira, quanto maior o influxo de sangue, mais energia será conduzida para longe da área de termoablação, portanto, menores as chances de dano térmico irreversível.

Além disso, os diferentes tipos celulares comportam-se de maneira variada frente à injúria térmica, sendo que alguns tecidos podem resistir a insultos repetitivos de calor que não

foram capazes de levar à morte celular imediata. Esta característica, chamada de termotolerância, esta ligada à expressão celular de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), como a HSP 70 e a HSP 60, que permitem reparos a danos celulares não fatais oriundos de injúria térmica (26,27,28,29,30). A área de transição, onde a temperatura atinge valores inferiores à área central, possibilita a expressão da proteína de choque térmico celular, que passa a tentar reverter os danos celulares causados pela alteração subletal de temperatura. O tecido tumoral, especificamente, apresenta um grande número destas proteínas, o que o deixa mais resistente ao aumento de temperatura (31). Portanto, temperaturas que não causam morte celular instantânea, podem causar danos reversíveis a células tumorais e irreversíveis a células normais, aumentando a preocupação de se criar temperaturas homogêneas capazes de gerar dano irreversível a toda área alvo.

No tratamento eficiente de uma lesão sólida renal por ARF, a zona central (morte celular completa) deve englobar toda a área tumoral, deixando a área de transição estender-se além dos limites do tumor.(figura 2) Apesar de assegurar tratamento oncológicamente adequado, o tamanho da lesão térmica pode ser muito maior que o desejado, ocasionando morte de tecido renal sadio, podendo até causar lesões a órgãos vizinhos ao rim. Portanto, tumores maiores que 4 cm ou com íntimo contato com vísceras adjacentes ao rim constituem obstáculos a ARF, já que lesões térmicas de grandes dimensões serão criadas podendo levar a lesões iatrogênicas e efeitos adversos significativos.

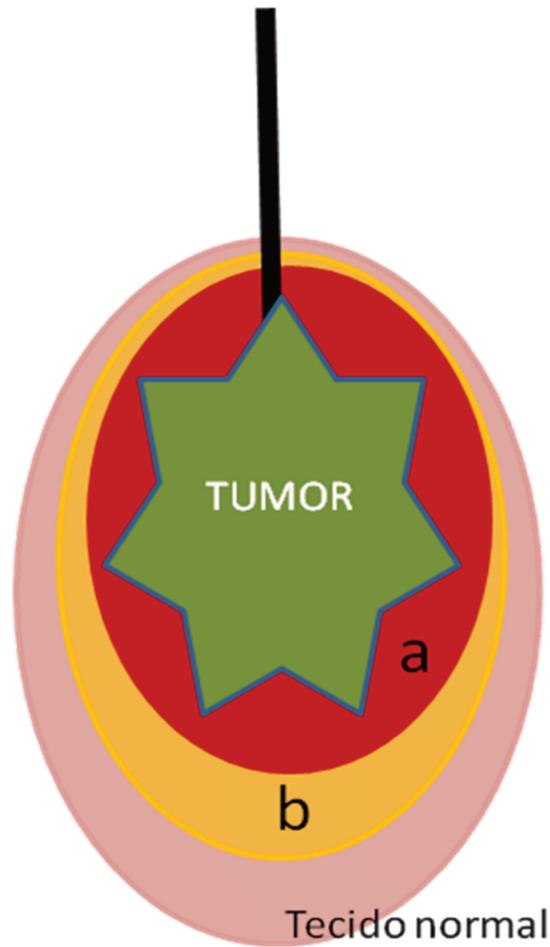


Figura 2: esquema ilustrativo da ARF em tumores renais. A zona central da termoablação (**a**) contendo todo o volume tumoral garante maior segurança oncológica ao método, às custas de maior dano ao tecido sadio circunjacente.

A eficiência do método está em garantir o dano irreversível da célula tumoral principalmente na periferia da área de termoablação, sem que haja aumento da área total da mesma, poupando tecido normal adjacente ao tumor. Frente a isso, modelos visando o aperfeiçoamento da ARF passaram a ser investigados. Surgiram adjuvantes farmacológicos como a doxirrubicina, um quimioterápico administrado sistemicamente com o objetivo de

fragilizar as células neoplásicas, tornando-as menos resistentes ao insulto térmico (32); infelizmente os efeitos colaterais da doxirrubicina limitaram sua aplicação clínica (33). Também, surgiram novas técnicas de ARF visando melhor difusão de calor, seja com influxo de solução hiperosmolar salina ou resfriamento contínuo da agulha de termoablação (31,34). Todos estes avanços mostraram-se insignificantes por não alterarem o aspecto característico das zonas oriundas da ARF.

Mais recentemente, foi demonstrado em estudos experimentais o uso de um novo modelo de tratamento em que nanopartículas entregam um determinado princípio ativo antitumoral preferencialmente ao tecido neoplásico, diminuindo os efeitos colaterais provenientes de seu uso sistêmico (intravenoso) e acumulando-se diretamente no tecido alvo (35). Este conceito relativamente novo mostrou-se particularmente interessante na complementação de tratamento termoablativo de tumores sólidos.

1.2 Nanopartículas

As nanopartículas são moléculas com dimensões menores que 100 μm , destacam-se na medicina moderna pelo potencial de ação farmacológica, diagnóstico e terapêutico (36). Atualmente e conforme mencionado anteriormente, seu papel terapêutico principal é baseado na capacidade de entrega direcionada e específica de substâncias químicas às áreas tumorais para sua ação, poupando o organismo dos efeitos não desejados relacionados à droga; ao mesmo tempo evita a inativação enzimática do medicamento e aperfeiçoa seus efeitos (35).

As nanopartículas exercem este papel de carreadores específicos devido a peculiaridades microestruturais dos vasos do tecido neoplásico. O endotélio normal é pouco permeável à

micropartículas, enquanto que a neovascularização característica das neoplasias apresenta poros, fenestrações, no endotélio que lhes confere uma permeabilidade única e exclusiva (37). Ao serem, então, injetadas na corrente sanguínea as nanopartículas alcançam os poros do endotélio do tumor, e se difundem ao interstício tumoral, exercendo localmente seu potencial terapêutico e diagnóstico (38).

1.2.1 Nanopartícula de Ouro e Fator alfa de necrose tumoral (TNF alfa)

O ouro pode ser reduzido a micrômetros mantendo suas características químicas, sendo designado ouro coloidal. Essa propriedade foi descoberta por Michael Faraday em 1857 (39). Na década de 1950 proteínas passaram a ser incorporadas ao ouro coloidal sem alterar suas propriedades farmacológicas, tornando-se uma ferramenta importante na área imunodiagnóstica e histológica (40). Neste mesmo período foi descrito o uso com sucesso do ouro coloidal radioativo no tratamento de tumores hepáticos e sarcomas (41,42).

No final da década de 1990 um estudo demonstrou que animais que receberam citocinas nativas manifestaram efeitos tóxicos sistêmicos (43), e quando as mesmas moléculas foram administradas aderidas ao ouro coloidal seus efeitos sistêmicos não foram reproduzidos. Entende-se, então, que o ouro coloidal exerce papel protetor ao organismo, frente aos efeitos tóxicos de fármacos antineoplásicos.

O TNF alfa sabidamente exerce efeitos deletérios ao crescimento tumoral por diferentes vias (44,45); porém, destaca-se a capacidade de diminuir o fluxo sanguíneo intratumoral. Este fenômeno é decorrente da apoptose endotelial gerada pela interação TNF alfa com receptores específicos do endotélio neoplásico, resultando em trombozes na microvasculatura tumoral,

diminuindo assim, o aporte de nutrientes e causando danos celulares (46). No entanto, o uso sistêmico do TNF alfa está associado a limitantes efeitos tóxicos (47).

O desenvolvimento de nanopartícula de ouro com TNF alfa humano foi realizado por bioengenheiros da Cytimmune®, embasados no potencial terapêutico oncológico do TNF alfa e no papel carreador específico da nanopartícula de ouro (48). Salienta-se que este composto recebeu a adição de polietilenoglicol (PEG), com finalidade de “escondê-lo” das células fagocitadoras do sistema retículo endotelial; permitindo que a nanopartícula circule livremente, e aos poucos, concentre-se no interstício tumoral, poupando o paciente dos efeitos colaterais do TNF alfa (48). (Figura 3)

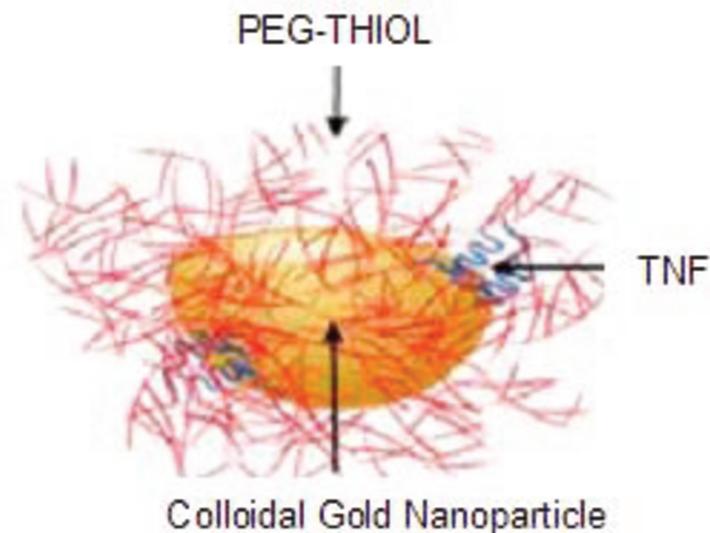


Figura 3: Nanopartícula de Ouro com TNF alfa. Demonstração esquemática do composto usado como adjuvante molecular na ARF de tumores renais sólidos.

A nanopartícula de ouro com PEG atinge o tamanho final de 27 μm , sendo menor que as fenestrações da neovasculatura tumoral, o que lhe confere a propriedade de se acumular especificamente no interstício tumoral. Desde então sua participação como agente terapêutico oncológico se desenvolveu significativamente, criando compostos terapêuticos dirigidos a um determinado tecido alvo (*target therapy*) (48).

1.3 Associação da nanopartícula de ouro com TNF alfa e ARF

A idéia da associação da ARF com uso adjuvante da nanopartícula de ouro foi fundamentada pela ação trombosante antitumoral do TNF alfa. Com a diminuição da circulação sanguínea local, a ação térmica nesta área pode ser potencializada, aumentando a eficiência do método (49). Além disso, as demais propriedades anticrescimento tumoral do TNF alfa são somadas à injúria térmica oriunda da ARF.

Portanto, o TNF alfa sensibiliza a célula neoplásica a danos irreversíveis quando exposta ao calor (49,50). Logo, temperaturas limítrofes (menores que 60 graus Celcius), onde o reparo celular poderia resultar em sobrevivência de certos clones celulares, estariam sujeitas a causar danos irreversíveis ou irreparáveis, pois o tecido alvo estaria previamente enfraquecido pelos efeitos do TNF alfa.

Esta nova modalidade de tratamento pode ser usada como complementação da termoablação de tumores renais localizados, visando a diminuição da área de transição com isso, os riscos de falha terapêutica e de efeitos não desejados.

O presente estudo foi desenhado para se demonstrar em modelo animal experimental os potenciais ganhos terapêuticos do uso conjunto da nanopartícula de ouro com TNF alfa e a ARF

no tratamento do câncer renal localizado. Espera-se que, através do uso deste adjuvante molecular, o tecido neoplásico seja sensibilizado ao insulto térmico, ampliando a zona de morte celular sem que se amplie a área total da lesão térmica, poupando, assim, tecido renal saudável; e aumentando ao mesmo tempo a eficácia de tratamento. (figura 4)

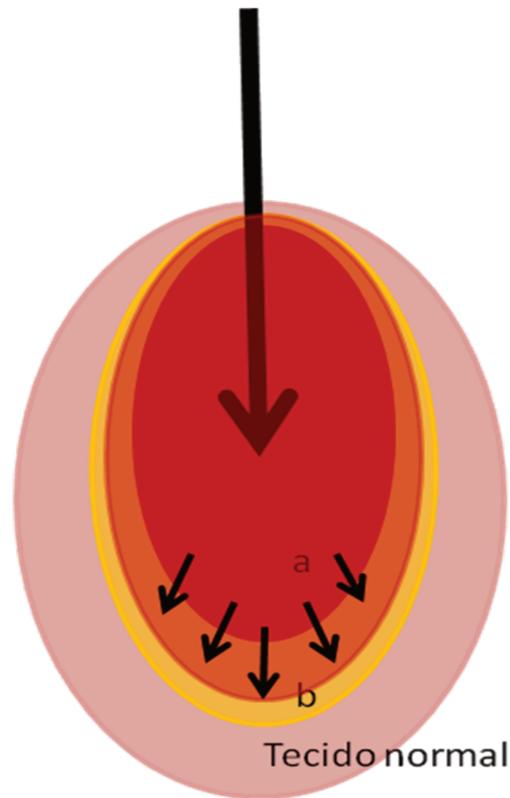


Figura 4: Exemplo esquemático reproduzindo o objetivo do uso de um adjuvante molecular à ARF. Notar a expansão da zona central (a) e diminuição da zona de transição (b), sem alterar a área total da termoablação (a+b).

2. Objetivo

Analisar o efeito adjuvante da nanopartícula de ouro com TNF alfa na termoablação por radiofrequência de tumores renais sólidos.

Use of Tumor Necrosis Factor- α -coated Gold Nanoparticles to Enhance Radiofrequency Ablation in a Translational Model of Renal Tumors

Renato Nardi Pedro, Thishore Thekke-Adiyat, Raghav Goel, Mithun Shenoi, Joel Slaton, Steve Schmechel, John Bischof, and James Kyle Anderson

OBJECTIVES	Radiofrequency ablation (RFA) has been most effective when the tumors are small, exophytic, and away from vital structures. We enlarged the size of the ablation kill zone by infusing a 30-nm tumor necrosis factor- α and polyethylene glycol-coated gold nanoparticle (CYT-6091, CytImmune Sciences, Inc.) before ablation in a rabbit kidney tumor model.
MATERIALS AND METHODS	A total of 37 New Zealand White rabbits had VX-2 tumors implanted into their bilateral kidneys; they were then split into 3 treatment groups of 10 rabbits each and a sham group of 7 rabbits as follows: (1) CYT-6091 only, (2) RFA only, (3) CYT-6091 followed 4 hours later by RFA. Gross and microscopic measurements of the ablation size as well as histologic analysis using hematoxylin and eosin staining were performed to determine the effect of CYT-6091 on the ablation.
RESULTS	The RFA + CYT-6091 group had a larger zone of complete cell death than the RFA-only group when measured on microscopic examination (0.30 ± 0.07 vs 0.23 ± 0.03 mL, $P = .03$). The zone of partially ablated tissue was smaller in the RFA + CYT-6091 group than in the RFA-only group (0.08 ± 0.02 vs 0.13 ± 0.05 mL, $P = .01$).
CONCLUSIONS	We have demonstrated the efficacy of CYT-6091 in enhancing RFA in a translational kidney tumor model. The potential usage of CYT-6091 to improve RFA of renal cell carcinoma merits further study. UROLOGY 76: 494–599, 2010. © 2010 Elsevier Inc.

The treatment of renal cell carcinoma (RCC) has progressed rapidly from the use of radical nephrectomy as the sole surgical treatment option to the increasing use of thermal ablative technologies, such as radiofrequency ablation (RFA) today. However, the use of nephron-sparing surgical treatment options has remained limited.¹ Ablative treatments such as RFA offer a minimally invasive and technically simple therapeutic option for small renal tumors. However, the number of tumors amenable to ablative therapies is limited because of restrictions on tumor size, relation to renal hilar structures, and tumor proximity to adjoining vital organs.²

Studies of high temperature thermal lesions have demonstrated that there are specific zones of cell injury as distance from the thermal probe increases.^{3,4} The inner zone (closer to the RFA probe) experiences the highest temperatures and comprises complete cell death. Coagulative necrosis is the landmark of this area. Next is a noticeable rim of thrombosis and vascular congestion. Grossly, a red halo is easily seen surrounding the margins

of the inner paleo-area of necrosis. External to this line of thrombosis, there is another layer of edema, inflammation, and partial cell injury amid viable cells. This is the incomplete kill zone, where there is a mixture of viable and nonviable cells. Beyond this zone, cellular viability remains intact.

To adequately treat a renal lesion with RFA, it is necessary to push the region of total cell death beyond the margin of the tumor. Unfortunately, the heat-induced injury within the incomplete kill zone extends even farther. Patient selection for percutaneous RFA becomes very important to limit damage to nearby vital organs, such as intestine, because heat-induced injury must extend well beyond the tumor edge. Previous efforts using liposomal doxorubicin attempted to increase the size of the complete cell death zone, but this technique has had limited clinical application.⁵

The possible solutions for augmenting thermal injury without increasing the energy deposition are to reduce tumor blood flow before heating and to increase the thermal sensitivity of the tumor and the tumor endothelium. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is of particular interest because it can affect both the cell and vascula-

From the Departments of Urology, Biomedical Engineering, Mechanical Engineering, and Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, MN

ture of the tumor with high potency. Unfortunately, systemic administration of TNF has dose-limiting toxicity; therefore, there is a need for selective tumor delivery of TNF to minimize systemic toxicity. Recently, gold nanoparticle-TNF- α —a delivery system capable of escaping phagocytic clearance by the reticuloendothelial system—has been investigated.⁶ It showed that the gold nanoparticles preferentially extravasated the tumor vasculature to accumulate TNF within the tumor interstitium while concomitantly reducing the accumulation of TNF in healthy organs that maintain greater control of vascular permeability, consequently limiting the systemic toxic effects.⁶

Based on the aforementioned premise, our goal was to investigate TNF- α -coated gold nanoparticles in a rabbit animal model as a novel molecular adjuvant to enhance RFA in the kidney. Our hypothesis was that use of this novel nanoparticle would minimize the size of the incomplete kill zone and thus maximize the volume of complete cell death.

MATERIALS AND METHODS

VX2 Carcinoma: Tumor Implantation

After we received approval from our Institutional Animal Care and Use Committee was obtained, New Zealand female rabbits weighing 2.2-2.7 kg were implanted with VX2 tumor in the hind limb or kidney. The animals were first anesthetized with an intramuscular injection of a solution containing ketamine (40 mg/kg), xylazine (5 mg/kg), and acepromazine (1 mg/kg), and they were then intubated and maintained on anesthesia for the surgical procedure by administering 0.75% isoflurane with 1 L/min of oxygen. Standard perioperative monitoring was performed. Because the VX2 tumors cannot be propagated *in vitro* using standard cell culture methods, the tumors were expanded in a subgroup of our animal model. This was done *in vivo* in the hind limb of our animal model by implanting a 1-mm³ tumor fragment under the fascia of the hind limb musculature. Tumors were harvested 2-3 weeks after implantation when a grossly visible and palpable mass of ~3-cm diameter was obtained. The animal was then sacrificed and harvested tumors were sliced into 1-mm³ fragments, frozen, and stored in sterile conditions within 1 mL of phosphate-buffered saline solution at -70°C for future use. For tumor implantation in the kidneys, a midline abdominal incision was made and both kidneys were exposed. A 1-mm³ piece of VX2 tumor was then implanted in the subcapsular region of the lower pole of the right kidney to prevent liver adhesions and the upper pole of the left kidney.

Radiofrequency Ablation

To achieve an optimal size of the tumor for ablation, a pilot study of 10 animals (20 kidneys) were implanted with VX2 tumors, and the diameter of the tumor on the cortical surface was measured using digital calipers at various time points after implantation. Radiofrequency ablation was performed after induction and maintenance of anesthesia as described before. The midline abdominal incision was reentered and the renal tumor mass was isolated from the surrounding organs and tissues. A modified 4-tine RF electrode (Starburst SDE, Rita Medical Systems, Mountain View, CA) and standard generator (1500×

generator Rita Medical Systems) were used. The only modification to the electrode was to cut the central fixed tine 4 mm from its base. The target temperature, ablation time, and length of the probe tines were the 3 variables of the RFA system that could be adjusted to attain a desired ablation area. Care was taken to insert the probe into the tumor mass perpendicular to the cortical surface of the tumor. Our goal was to create a thermal injury zone that was contained within the tumor. This was achieved with the following settings: target temperature of 60°C, treatment time of 2 minutes, and tine deployment of 7 mm. The size and morphology of the ablation area with these settings were consistently reproduced in multiple trials and used in the final treatment groups described next. Data from this pilot group was used solely to determine optimal RFA settings and timing of optimal tumor growth.

Nanoparticle Description

CYT-6091 (CytImmune Sciences, Rockville, MD) is a multivalent drug consisting of a nanoparticle of colloidal gold bonded to ~400 TNF- α molecules and thiol-derivatized polyethylene glycol (PEG). The gold core of the nanoparticle is 30 nm, whereas the PEG brush layer extends another 10 nm from the surface and assists the particle in avoiding the reticuloendothelial system (RES), thereby passively accumulating in the leaky tumor microvasculature and allowing active binding of the TNF- α with tumor cells.^{6,7}

Treatment Groups

RFA only. Ten kidneys with VX2 tumor were treated with RFA 10-14 days after the implant (see result on optimal tumor growth). The settings used for the ablation were 60°C target temperature for 2 minutes and tine deployment of 7 mm, for the reasons mentioned before. The tumors were easily located after exposure of the kidneys and the RFA probe was inserted into the center of the visible tumor mass on the surface of the kidney.

Nano only. Ten kidneys with VX2 tumor were treated only with CYT-6091 10-14 days after the implant. The drug was administered intravenously 4 hours before the surgical procedure at a dose of 200 μ g/kg. This dose has previously been shown to enhance thermal therapies in various preclinical tumor models.⁸⁻¹⁰ The surgical procedure comprised only dissection and exposure of the kidney and visualization of the tumor mass, without any invasive manipulation.

RFA plus Nano. Ten kidneys with VX2 tumor were treated with RFA in addition to CYT-6091 10-14 days after the implant. The drug was administered intravenously 4 hours before the surgical procedure at a dose of 200 μ g/kg. The surgical procedure comprised kidney dissection and tumor identification. RFA was performed as described previously.

Sham. Seven kidneys with VX2 tumor were used in the sham group. These animals did not receive either RFA treatment or CYT-6091. The same surgical steps were performed in these animals as for the aforementioned groups. VX2 tumor was implanted into the kidneys and allowed to grow for 10-14 days. The sham procedure comprised only dissection and broad exposure of the kidney and visualization of the tumor mass, without any invasive manipulation.

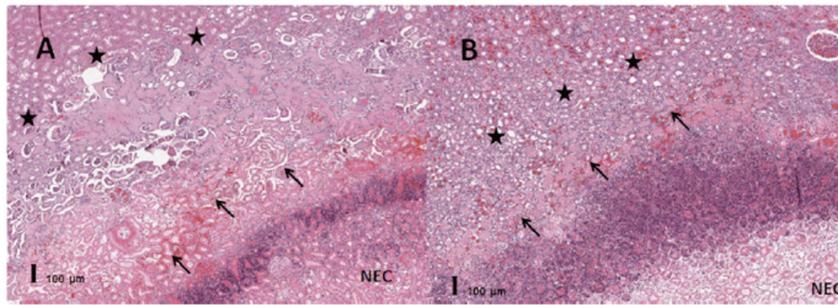


Figure 1. Microscopic findings: tips of arrows show the area corresponding to the beginning of the hemorrhagic rim and the end of the complete cell death zone. The stars mark the end of the thermal injury. The central necrotic area is demarcated as Nec. The difference in the diameter of the zone of incomplete cell death (zone between the arrows and stars) is noticeably different between (A) RFA only and (B) RFA plus CYT-6091. Scale Bar as shown.

Postablation Monitoring and Postsacrifice Analysis

From the injection of CYT-6091 through the perioperative period after the RFA procedure, the blood pressure, oxygen saturation, and temperature were monitored. Subsequently, the rabbits were checked daily for signs of malaise, poor appetite, low activity level, respiratory difficulty, or other signs of systemic illness. Postoperative monitoring was done with the intent of identifying side effects caused by CYT-6091. Necropsy was performed 4 days after the procedure. Using the initial pilot study rabbits, an initial histologic analysis was done at various time points ranging from 1-7 days to determine the optimal time after ablation for histologic analysis. At 4 days post ablation, the different zones of cell injury could be identified easily within the treatment area on hematoxylin and eosin (H&E) staining. A single pathologist with significant experience in thermal injury histology reviewed all slides and was blinded to the treatment groups.

The kidneys were harvested, immediately bivalved, and cut into 3-mm-thick slices perpendicular to the probe track. The tissue sections underwent overnight formalin fixation and standard histologic processing with H&E staining. The slides were scanned at a magnification of 20 \times using an Aperio scan scope CS scanner (Aperio Technologies, Vista, CA). The zones of complete cell death and total thermal injury (zone of complete cell death plus zone of incomplete cell death) were measured from the center of probe tract using the scanned images. The zone of complete cell death was measured from the center of the probe to the first viable cell (Fig. 1). The zone of thermal injury was measured from the probe center to the last dead cell. The zone of incomplete cell death was defined as the area between the margins of these 2 zones. The measurements were performed using Aperio Image scope software (v. 9.0.19.1516). Tumor volumes were estimated with the equation of an ellipsoid volume = length \times width \times height \times 0.52.¹¹ The different thermal injury zone volumes were calculated for each 3-mm histologic slice cut from the tumor specimen. The volume for each zone for each 3-mm slice was then summed to achieve the total volume for that respective zone. Values are reported with 95% confidence intervals. Two-tailed Student's *t*-test was conducted to determine statistical significance between different groups; *P* < .05 was considered significant.

RESULTS

Assessment of the Ideal Tumor Size for RFA

The ideal tumor for testing the enhancement effect of CYT-6091 would be a firm, intact, solid mass contained within the renal capsule of the largest diameter possible, without gross evidence of necrosis or distant metastases. Between days 10-14 after implantation, the tumors reached 5-10 mm in diameter (average 7.4 ± 0.8 mm). After day 20 of tumor implantation, the tumor growth appeared exponential, eventually attaining diameters of 20-30 mm, frequently with peritoneal carcinomatosis and grossly visible tumor necrosis. Hence, the day 14 time point after implantation was chosen for administration of treatments in the various groups.

Macroscopic Findings

Four days after the treatments, the kidneys treated with RFA with or without CYT-6091 preadministration had ellipse-shaped ablation areas that on sectioning revealed concentric lesions extending from the capsule to the renal medulla. The following components could be identified on the gross cross section of the ablation area: (A) a large central paleo-area surrounded by (B) a dark red rim, and (C) another paleo-outer layer (Fig. 2). No such lesions were evident in the sham or Nano-only groups. Nevertheless, tumor growth was altered by the administration of the nanoparticle. The average volume of the tumor mass in the sham group was 0.80 ± 0.14 cm³, whereas the Nano-only group presented a tumor volume of 0.54 ± 0.37 cm³ (*P* = .038) on necropsy 4 days after treatment.

Microscopic Findings

Distinct histologic regions of the thermal lesion were evident on H&E-stained sections of the RFA-treated kidneys. These regions occurred concentric to the location of the RFA probe tract and were similar in shape and size to the macroscopically observed discolored lesions. The region immediately adjacent to the probe tract was comprised mostly of cell debris with complete absence of

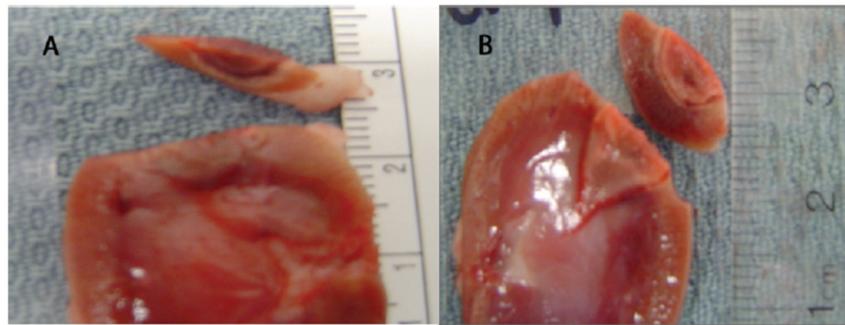


Figure 2. Macroscopic findings. (A) With RFA alone the hemorrhagic rim is embraced by a wide white external layer, both surrounding a central necrotic area. (B) With RFA plus CYT-6091 the external layers are narrower and more easily defined.

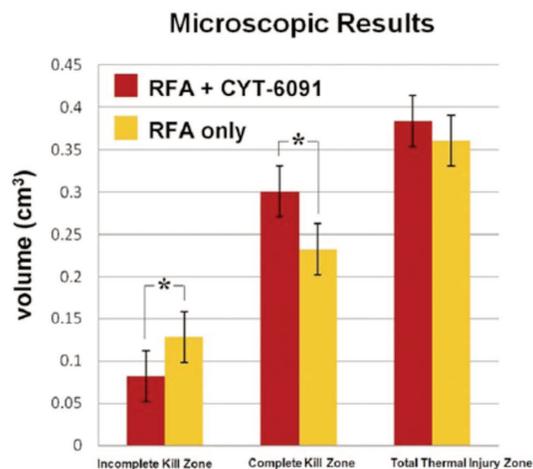


Figure 3. Volumes of different thermal injury zones in the RFA only versus RFA plus CYT-6091 based on microscopic measurements. Error bars represent 95% confidence intervals.

viable tubular or tumor cells. Few scattered inflammatory cells were also present in this region. This zone was characteristic of coagulative necrosis and labeled the complete cell death zone. The volume of this zone in the RFA + Nano group was significantly greater than the RFA-only group (0.30 ± 0.07 vs 0.23 ± 0.03 cm³, $P = .03$) (Fig. 3). This corresponds to a 23.3% increase in volume of the complete cell death zone in the RFA + Nano group.

The dark red rim observed macroscopically corresponded with a band of vascular congestion and thrombosis, which coincided with the beginning of the incomplete cell death zone in all RFA-treated kidneys. The volume of the incomplete cell death zone in the RFA + Nano group was significantly smaller than the RFA-only group (0.08 ± 0.02 vs 0.13 ± 0.05 cm³, $P = .01$), a decrease of 38.4%. Interestingly, there was no significant difference in the volumes of the total thermal injury zone between the RFA-only and the RFA + Nano groups (0.38 ± 0.07 vs 0.36 ± 0.08 cm³, $P = .98$).

COMMENT

Compared with conventional surgical treatments of RCC, RFA offers many advantages. It can be delivered via a percutaneous technique that is relatively easy to learn and has few complications and low patient morbidity.^{12,13} However, there are limitations with this treatment that include difficulty treating tumors >4 cm in diameter, difficulty treating tumors that abut vital anatomic structures, and incomplete ablation rates of up to 9.1%.² Although resolution of all of these problems will likely require improvements in ablation device design and radiologic monitoring of ablation, the use of an adjuvant agent to enhance the thermal ablation is an appealing option. Previous authors have investigated a number of different means of achieving this goal. Initially mechanical means were used to occlude vascular flow into the kidney at the time of ablation. This unfortunately led to an unpredictable and uncontrollable ablation.¹⁴ Further efforts were focused on pharmacologic manipulation. Arsenic trioxide, liposomal doxorubicin, and sorafenib have all been studied as adjuvants to RFA in the kidney. These adjuvants are directly cytotoxic to tumor cells (doxorubicin) or tumor vasculature (sorafenib). In normal rabbit kidney tissue, Ahmed et al. found that injection of liposomal doxorubicin 30 minutes after RFA resulted in a significantly larger ablation (11 vs 7.9 mm, $P = .026$), but in contrast to our findings, the hemorrhagic rim expanded with the adjuvant as opposed to decreasing in size.¹⁵ The authors speculated that RFA causes increased accumulation of liposomal doxorubicin in the tumor tissue and causes direct cytotoxicity of tumor cells. More recently, the same group investigated sorafenib in a murine RCC animal model. Here tumors were implanted subcutaneously on the abdominal wall. Again, the addition of an adjuvant increased the RFA size significantly from 6.7 to 11.1 mm ($P < .01$).¹⁶ However, sorafenib needed to be administered daily until a minor reduction in tumor size was observed before administering RFA therapy. Despite this promising *in vivo* work, these adjuvants are not yet commonly used clinically.

Here we propose a novel nanoparticle-based adjuvant, CYT-6091, for enhancing renal RFA. This nanoparticle

has been previously well studied in vivo and in an early phase I clinical trial. Initially, TNF- α was studied as an adjuvant thermal ablation agent. However, resulting systemic effects were prohibitive. Thus, TNF- α was bonded to gold nanoparticles in the hopes of maximizing tumor delivery and minimizing systemic effects.⁶ An initial phase I clinical trial has been done using CYT-6091 as a treatment (without ablation) for patients with solid organ tumors resistant to standard therapies. Although this trial did not involve thermal ablation, it showed minimal to no systemic effects of CYT-6091 in 16 humans over a short course of treatment.¹⁷ In regard to its thermal adjuvant properties, CYT-6091 has been tested in multiple animal tumor model systems. Visaria et al. demonstrated that pretreatment of both murine fibrosarcoma and murine mammary tumors with CYT-6091 before hyperthermia treatment lead to significant decreases in tumor volume relative to either CYT-6091 or hyperthermia alone.^{8,9} Interestingly, a similar effect can be seen with cryoablation as well. Goel and colleagues used a dorsal skin fold chamber to show that appropriate dosing of CYT-6091 increases the threshold temperature for necrosis in LNCaP prostate cancer tumors during cryoablation from -14 to -1.5°C .¹⁰ In contrast to the adjuvants described earlier, we believe that a single intravenous administration of appropriately dosed CYT-6091 selectively presensitizes tumor vasculature to thermal cytotoxic effects thus enhancing the tumor destructive effects of RFA. As a corollary to our current study, we performed similar experiments using CYT-6091 with cryoablation as opposed to RFA. Due to difficulties with tumor regrowth into the ablation area it was not possible to confirm an enlarged ablation area, but we did see a marked change in metastasis rates with 8 out of 10 animals in the cryoablation only arm versus only 1 out of 10 animals in the CYT-6091 plus cryoablation arm showing metastatic disease.¹⁸

Our experimental model has a number of potential weaknesses. The clinical application of this technology is treatment of renal cell carcinoma, but no available animal model of renal cell carcinoma can support sufficient tumor growth within the kidney to allow reproducible measurement of CYT-6091 induced changes in ablation volume. Thus, while CYT-6091 has shown effectiveness in a variety of tumors and both RFA and cryoablation, it is possible that its effects may differ with renal cell carcinoma. Finally, within this model we have not yet varied the administration timing or dosage of CYT-6091. Clearly, potential for changes in efficacy exist when moving to human trials.

CONCLUSIONS

In the current study we have demonstrated the efficacy of CYT-6091 in enhancing radiofrequency ablation in a translational kidney tumor model. While CYT-6091 administration alone had a significant effect on reducing tumor volume, the combination of radiofrequency abla-

tion and CYT-6091 produced the most significant results by increasing the size of the complete cell death (central necrosis) zone and minimizing the incomplete cell death zone within the thermal lesion. The potential usage of CYT-6091 to improve radiofrequency ablation of renal cell carcinoma merits further study.

References

- Berger A, Crouzet S, et al. Minimally invasive nephron-sparing surgery. *Curr Opin Urol*. 2008;18(5):462-466. [Review].
- Levinson AW, Su LM, et al. Long-term oncological and overall outcomes of percutaneous radio frequency ablation in high risk surgical patients with a solitary small renal mass. *J Urol*. 2008; 180(2):499-504; [Discussion:504].
- Margulis V, Matsumoto ED, et al. Acute histologic effects of temperature-based radiofrequency ablation on renal tumor pathologic interpretation. *Urology*. 2004;64(4):660-663. [Review].
- Rehman J, Landman J, et al. Needle-based ablation of renal parenchyma using microwave, cryoablation, impedance- and temperature-based monopolar and bipolar radiofrequency, and liquid and gel chemoablation: laboratory studies and review of the literature. *J Endourol*. 2004;18(1):83-104. [Review].
- Ahmed M, Goldberg SN. Combination radiofrequency thermal ablation and adjuvant IV liposomal doxorubicin increases tissue coagulation and intratumoural drug accumulation. *Int J Hyperthermia*. 2004;20:781-802.
- Goel R, Shah N, Visaria R, Paciotti GF, Bischof JC. Biodistribution of TNF-alpha-coated gold nanoparticles in an in vivo model system. *Nanomedicine*. 2009;4(4):401-410.
- Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, Tamarkin L. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv*. 2004;11(3):169-183.
- Visaria RK, Griffin RJ, et al. Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor-alpha delivery. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(4):1014-1020.
- Visaria R, Bischof JC, et al. Nanotherapeutics for enhancing thermal therapy of cancer. *Int J Hyperthermia*. 2007;23(6):501-511.
- Goel R, Swanlund D, et al. TNF-alpha-based accentuation in cryoinjury—dose, delivery, and response. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(7):2039-2047.
- Boehm T, Folkman J, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*. 1997; 390(6658):404-407.
- Carraway WA, Raman JD, Cadeddu JA. Current status of renal radiofrequency ablation. *Curr Opin Urol*. 2009;19(2):143-147.
- Anderson JK, Cadeddu JA. Radiofrequency ablation: the preferred minimally invasive treatment. *J Endourol*. 2008;22(9):1913-1915.
- Corwin TS, Lindberg G, et al. Laparoscopic radiofrequency thermal ablation of renal tissue with and without hilar occlusion. *J Urol*. 2001;166(1):281-284.
- Ahmed M, Liu Z, Lukyanov AN, et al. Combination radiofrequency ablation with intratumoral liposomal doxorubicin: effect on drug accumulation and coagulation in multiple tissues and tumor types in animals. *Radiology*. 2005;235(2):469-477.
- Hakimé A, Hines-Peralta A, et al. Combination of radiofrequency ablation with antiangiogenic therapy for tumor ablation efficacy: study in mice. *Radiology*. 2007;244(2):464-470.
- Libutti SK, Paciotti GF, et al. Preliminary results of a phase I Clinical Trial of CYT-6091: a pegylated colloidal gold-TNF nanomedicine—ASCO 2007. *Abstracts*; 3603.
- Pedro R, Thekke-Adiyat K, Shenoi M, Goel R, Schmechel S, Slaton J, Bischof J, Anderson K. Molecular enhancement of thermal ablation therapies using TNF-alpha coated gold nanoparticles in a translational model of renal tumors. *Design of Medical Devices Conference*; April 2009].

4. Discussão

Comparado aos tratamentos cirúrgicos convencionais para o câncer renal, a ablação por radiofrequência oferece a vantagem de ser menos invasiva, diminuindo a morbidade do tratamento e facilitando a recuperação do paciente (51). Além disso, pode ser realizada via percutânea atribuindo a característica ambulatorial ao um procedimento anteriormente relacionado à internação hospitalar (52). A técnica cirúrgica relacionada à termoablação de tumores renais, que engloba a ARF, requer teoricamente, menor curva de aprendizado quando comparada com as vias laparoscópica ou aberta convencional, pois compreende menos etapas operatórias (52). Nos pacientes com grande risco cirúrgico, a termoterapia de lesões sólidas renais tem um papel ainda mais forte por exigir menor tempo de recuperação pós-operatória e por expor o paciente a menor injúria física (52,53).

A experiência clínica atual limita o emprego da termoablação para massas renais sólidas menores que 4 cm (54,55). Quando dirigidas para lesões tumorais maiores que 4 cm os índices de falha terapêutica e efeitos adversos tornam-se muito significativos (51,55,56). Dado que mais da metade dos tumores renais tratados cirurgicamente são maiores que 4 cm (57), uma porção significativa destes não pode ser abordada eficiente e seguramente com a tecnologia de termoablação existente. Recentemente, foram publicados dois estudos clínicos, de acompanhamento a longo prazo (cinco anos), do uso da ARF em tumores renais sólidos, sendo descritas taxas concordantes de sucesso maiores que 90% e de recidiva tumoral de 8.6 e 9.1% (58,59).

Estes dados despertaram a necessidade do refinamento deste método, no intuito de melhorar, ainda mais, sua eficiência e segurança oncológica. Assim o uso de métodos

complementares a esta modalidade minimamente invasiva de tratamento passaram a ser discutidas.

Inicialmente foi descrito em um modelo experimental o clampeamento mecânico do hilo renal concomitante a ARF; visando potencializar a injúria térmica, ao diminuir o aporte sanguíneo a área alvo. Os autores observaram que, apesar do aumento do volume de injúria térmica, a lesão resultante passou a ser imprevisível e descontrolada (60). Também foi estudado o uso de solução salina hiperosmolar durante a ARF, com o intuito de gerar melhor condução elétrica ao tecido alvo; e, portanto, criando áreas maiores e mais homogêneas de temperaturas altas (34). Porém, o meio hiperosmolar criado pode gerar um aumento da impedância tecidual (por desidratação) que por sua vez, limitaria a propagação de célula a célula da energia de radiofrequência, o que restringe a área final de ablação. Além disso, as mesmas características histológicas da área de injúria térmica foram descritas nesta variação técnica, permanecendo a necessidade de se criar lesão maior que os limites tumorais para fins oncológicamente eficazes (34).

Frente ao pouco sucesso obtido com as variantes técnicas da termoablação, o uso de fármacos como forma adjuvante à ARF ganhou foco especial. Diferentes agentes quimioterápicos para complementação da termoablação de tumores renais foram testados (32,61,62). Ahmed et al (32) usaram a doxirrubicina lipossomal como adjuvante a ARF em um modelo animal experimental. A infusão deste quimioterápico 30 minutos após a ARF desencadeou uma lesão térmica significativamente maior do que a vista exclusivamente como uso da ARF. Segundo concluído pelos autores deste trabalho os efeitos citotóxicos da doxirrubicina estariam potencializados pela injúria térmica previamente causada no tecido alvo,

ocasionando o maior volume da lesão. Porém, diferentemente do que foi descrito em nosso estudo, a área de transição também aumentou de forma proporcional, mantendo as limitações clínicas da indicação do uso da ARF para tumores renais sólidos de pequeno tamanho. Resultados semelhantes ao estudo de Ahmed et al (32) foram descritos por Goldberg et al (33) com o uso da doxirrubicina lipossomal previamente à ARF, porém, estes autores ressaltaram os efeitos tóxicos observados após a administração intravenosa deste quimioterápico nos animais de experimentação.

Hakime et al (62) testaram o uso de outro quimioterápico, sorafenib, como adjuvante a ARF em um modelo de tumor renal implantado no subcutâneo da parede abdominal de ratos. O sorafenib atua no endotélio da neovascularização tumoral, diminuindo seu crescimento e provocando colapso, e, com isso reduz o aporte sanguíneo tecidual. Este quimioterápico foi administrado diariamente até que se fosse notado uma diminuição do volume tumoral, quando então, o tratamento era complementado com ARF. A área total da injúria térmica também mostrou-se significativamente maior, além disso a necessidade do uso diário de sorafenib implicou em efeitos colaterais e pode, futuramente, limitar seu uso clínico em animais de maior porte.

O uso de quimioterápicos atrelados a nanopartículas para o tratamento de tumores sólidos nasceu do conhecimento das características exclusivas da vasculatura tumoral, que apresentam-se mais permeáveis a elas que o endotélio normal (35,36,37). Este conceito, teoricamente, possibilitaria a redução dos efeitos colaterais do uso sistêmico de quimioterápicos altamente tóxicos, por executar a entrega dirigida destas substâncias ao tecido alvo neoplásico. Além de proporcionar maior concentração do princípio ativo no parênquima tumoral, possibilitando maior

eficiência terapêutica. Como prova clínica desta hipótese, estudos clínicos de fase I e II foram publicados, ressaltando a segurança do uso de diferentes agentes quimioterápicos ligados a nanopartículas de diferentes estruturas químicas. Todos os estudos demonstraram que os compostos se acumularam no tecido neoplásico em maior concentração em relação ao uso desvinculado à nanopartículas, sem proporcionar os efeitos tóxicos limitantes, promovendo também ganho de sobrevida câncer-específica, sinais diretos de retardo crescimento tumoral ou regressão de massas tumorais (63,64,65,66,67). A nanopartícula de ouro com TNF alfa, desenhada de maneira a diminuir os efeitos tóxicos do uso parenteral do TNF alfa puro, destacou-se em dois destes estudos clínicos (66,67). O TNF alfa promove uma cascata inflamatória tecidual complexa no tecido neoplásico, resultando entre outros, em necrose hemorrágica e trombose vascular (43,44,45,46,68). Esta propriedade sensibiliza a célula neoplásica aos efeitos do aumento de temperatura, pois a mesma já sofre com as conseqüências bioquímicas da restrição sanguínea sendo também privada do efeito físico de dissipação de calor exercido pelo fluxo sanguíneo ininterrupto (43,44,45,46).

Pesquisas pioneiras desenvolvidas por Paciotti et al (43) e Visaria et al (49,50) com a nanopartícula de ouro com TNF alfa testaram a capacidade deste adjuvante molecular em aumentar o dano celular tumoral, exclusivamente, na presença de calor, com resultados motivadores. Destaca-se o estudo de Visaria et al (49) que demonstraram, em modelos de crescimento celular “in vitro” e “in vivo” pré-tratados exclusivamente com nanopartícula de ouro e TNF alfa, o impacto negativo no crescimento e na fisiologia tumoral destes clones celulares. E, quando estes modelos pré-tratados foram associados à injúria hipertérmica sua susceptibilidade a esta foi significativamente ampliada, traduzida em uma queda na contagem total de células viáveis (49,50).

Goel et al (69) estudaram o uso parenteral adjuvante da nanopartícula de ouro com TNF alfa como sensibilizador da termoablação do adenocarcinoma de próstata cultivado no subcutâneo de ratos. Temperaturas escalonadas foram aplicadas ao tecido neoplásico, previamente ou não tratados com o composto, até que se atingisse morte celular. O grupo pré-tratado apresentou morte celular com temperaturas mais perto do limite tolerável (temperaturas menores), reforçando o papel sensibilizador do composto frente a injúria térmica. Este dado é de especial interesse neste estudo, pois temperaturas limítrofes são detectadas na zona de transição da ARF, justificando o uso do composto para estender a área de morte celular até os limites externos da termoablação. Hipótese verificada nos resultados deste modelo experimental.

Em outro interessante estudo, Goel et al (70) publicaram a predileção da nanopartícula de ouro com TNF alfa em se concentrar no tecido tumoral, sem causar efeitos colaterais sistêmicos do TNF alfa em modelos animais. Observou-se também neste estudo que a concentração tecidual da nanopartícula na área alvo atingiu seu pico após 3 a 4 horas da administração intravenosa; fato condizente com horário de administração do composto no presente estudo. Após este período, as moléculas de ouro coloidal passam a se acumular preferencialmente no fígado, de onde são eliminadas (69). Optamos pela administração parenteral do composto quatro horas antes da ARF, embasado em estudos preliminares desenvolvidos por Visaria et al (49,50), que demonstraram ser tempo suficiente para sensibilizar as células neoplásicas aos efeitos da injúria hipertérmica. Somente após a execução deste trabalho é que Goel et al (69) publicaram os resultados da biodistribuição da nanopartícula de ouro com TNF alfa, corroborando com o planejamento terapêutico usado em nosso estudo.

Recentemente foi publicado um estudo (71) em que a nanopartícula de ouro com TNF alfa foi utilizada como adjuvante a crioablação de tumores uterinos em um modelo animal experimental. Os autores reportaram que os grupos que receberam, por via intravenosa, somente composto ou o composto previamente a crioablação (4 horas antes) apresentaram melhor resposta clínica traduzida em menor crescimento tumoral e maior morte celular (respectivamente) nos 30 dias de acompanhamento pós tratamento. Aqueles que foram tratados com injeção intralesional do composto apresentaram efeitos colaterais e menor resposta clínica. Os resultados obtidos nos grupos que receberam o composto por via parenteral, são comparáveis aos vistos no presente estudo, em que houve desaceleração do crescimento tumoral frente ao uso exclusivo do composto (Grupo Sham) e máxima eficácia de tratamento termoablativo quando seguido à administração do composto.

Portanto, o presente estudo demonstrou e reforçou que o uso da nanopartícula de ouro com TNF alfa sensibiliza o insulto térmico sofrido por tumores sólidos decorrentes da ARF em um modelo animal de tumor renal bem conhecido. Assim como possibilitou um retardo no crescimento tumoral quando apenas o composto foi usado em comparação ao grupo sem tratamento. Interessante e contrariamente aos trabalhos previamente realizados com doxirrubicina e sorafenib, não descrevemos aumento significativo do volume total da área de termoablação; porém, e, de acordo com os trabalhos de Visaria et al (49,50), Goel et (69) al e Jiang et al (71), a morte celular secundária à ARF foi significativamente maior (representado pelo volume da área central) nos grupos pré-tratados com o composto. Objetivamente, reportamos que o volume da área de transição diminuiu cerca de 38.4%, enquanto que o volume total da termoablação permaneceu sem mudanças significativas, o que nos leva a concluir que o volume da zona de morte celular completa (central) expandiu-se em direção a periferia

constituindo a maioria da lesão térmica final. Isso pode ser traduzido clinicamente como uma maneira de se potencializar o tratamento da termoablação por radiofrequência, acrescentando maior eficiência oncológica (por causar mais morte celular); e, por proporcionar maior segurança já que o volume total da termoablação pode ser restringido a perto do equivalente do volume da massa tumoral, evitando assim danos ao parênquima renal sadio e aos órgãos com íntimo contato com a lesão tumoral.

A união do uso de nanopartículas, quimioterápicos e modalidades cirúrgicas específicas abre portas ao desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas eficientes no combate ao câncer.

5. Conclusão

O uso adjuvante da nanopartícula de ouro com TNF alfa atribuiu à termoablação maior capacidade em proporcionar morte celular ao tecido neoplásico; sem no entanto, aumentar o volume total da área afetada. É correto afirmar, portanto, que houve um ganho qualitativo nos resultados da ARF.

6. Referência Bibliográfica

1. Carson WJ. Tumors of the kidney: Histologic study. Trans Sec Urol AMA 1928.
2. Harrison JH, Gittes RF, Perlmutter AD. Campbell's Urology, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1980:967-1009.
3. American Cancer Society - Cancer facts and figures 2009.
<http://www.cancer.org/downloads/STT/500809web.pdf>
4. American Cancer Society - Statistics for 2001. <http://www.cancer.org/downloads/STT>
5. Konnak JW, Grossman HB. Renal cell carcinoma as an incidental finding. J Urol 1985; 134:1094-6.
6. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. Nat Rev Urol. 2010; 7(5):245-57.
7. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. N Engl J Med. 1996; 335(12):865-75. Review.
8. 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. Review.
9. Elson PJ, Witte RS, Trump DL. Prognostic factors for survival in patients with recurrent or metastatic renal cell carcinoma. Cancer Res. 1988; 48(24 Pt 1):7310-3. Review.
10. Sokoloff MH, Figlin RA, Belldegrun A. Management of metastatic renal cell carcinoma. AUA update series: vol. XV 1996; 30:238.

11. Dunn MD, Portis AJ, Shalhav AL, Elbahnasy AM, Heidorn C, McDougall EM et al. Laparoscopic versus open radical nephrectomy: a 9-year experience. *J Urol.* 2000; 164(4):1153-9.
12. Robson CJ. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol.* 1963; 89:37-42.
13. Licht MR, Novick AC. Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma. *J Urol.* 1993; 149(1):1-7. Review.
14. Campbell SC, Novick AC, Belldegrun A, Blute ML, Chow GK, Derweesh IH et al. Practice Guidelines Committee of the American Urological Association. Guideline for management of the clinical T1 renal mass. *J Urol.* 2009; 182(4):1271-9.
15. Touijer K, Jacqmin D, Kavoussi LR, Montorsi F, Patard JJ, Rogers CG, Russo P et al. The expanding role of partial nephrectomy: a critical analysis of indications, results, and complications. *Eur Urol.* 2010; 57(2):214-22. Review.
16. Berger A, Crouzet S, Canes D, Haber GP, Gill IS. Minimally invasive nephron-sparing surgery. *Curr Opin Urol.* 2008; 18(5):462-6. Review.
17. Ogan K, Cadeddu JA. Minimally invasive management of the small renal tumor: review of laparoscopic partial nephrectomy and ablative techniques. *J Endourol.* 2002; 16(9):635-43. Review.
18. Heuer R, Gill IS, Guazzoni G, Kirkali Z, Marberger M, Richie JP et al. A critical analysis of the actual role of minimally invasive surgery and active surveillance for kidney cancer. *Eur Urol.* 2010; 57(2):223-32. Review.

19. Lu DS, Raman SS, Vodopich DJ, Wang M, Sayre J, Lassman C. Effect of vessel size on creation of hepatic radiofrequency lesions in pigs: assessment of the "heat sink" effect. *AJR Am J Roentgenol.* 2002; 178(1):47-51.
20. Rendon RA, Kachura JR, Sweet JM. The uncertainty of radiofrequency treatment of renal cell carcinoma: findings at immediate and delayed nephrectomy. *J Urol.* 2002; 167:1587.
21. Calkins H, Langberg J, Sousa J. Radiofrequency catheter ablation of accessory atrioventricular connections in 250 patients. Abbreviated therapeutic approach to Wolff-Parkinson-White syndrome. *Circulation* 1992; 85:1337-46.
22. Phipps JH, Lewis BV, Roberts T. Treatment of functional menorrhagia by radiofrequency-induced thermal endometrial ablation. *Lancet* 1990; 335:374-6.
23. Zlotta AR, Wildschutz T, Raviv G, Peny MO, van Gansbeke D, Noel JC, et al. Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) is a possible new modality for treatment of renal cancer: ex vivo and in vivo experience. *J Endourol.* 1997; 11(4):251-8.
24. McGovern FJ, Wood BJ, Goldberg SN, Mueller PR. Radio frequency ablation of renal cell carcinoma via image guided needle electrodes. *J Urol.* 1999; 161:599-600.
25. Lepock JR. Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage. *Int J Hyperthermia* 2003; 19:252-66.
26. Lepock JR. Protein denaturation during heat shock. *Adv. Molec. Cell Biol.* 1997; 19:223-259.
27. Organ LW. Electrophysiologic principles of radiofrequency lesion making. *Appl Neurophysiol* 1977; 39:69-76.

28. Hsu TH, Fidler ME, Gill IS. Radiofrequency ablation of the kidney: acute and chronic histology in porcine model. *Urology*. 2000; 56(5):872-5.
29. Ryan TP, Goldberg SN. Comparison of simulation and experimental results for RF thermal treatment devices with or without cooling. *Proc SPIE* 1999; 3594:14-25.
30. Lepock JR, Kruuv J. Thermotolerance as a possible cause of the critical temperature at 43 degrees in mammalian cells. *Cancer Res* 1980; 40:4485-8.
31. Urano M. Tumor response to hyperthermia. *Hyperthermia and Oncology* 1988; 1:161-200.
32. Ahmed M, Liu Z, Lukyanov AN. Combination radiofrequency ablation with intratumoral liposomal doxorubicin: effect on drug accumulation and coagulation in multiple tissues and tumor types in animals. *Radiology* 2005; 235:469-77.
33. Goldberg SN, Girnan GD, Lukyanov AN. Percutaneous tumor ablation: increased necrosis with combined radio-frequency ablation and intravenous liposomal doxorubicin in a rat breast tumor model. *Radiology* 2002; 222:797-804.
34. Munver R, Threatt CB, Delvecchio FC, Preminger GM, Polascik TJ. Hypertonic saline-augmented radiofrequency ablation of the VX-2 tumor implanted in the rabbit kidney: a short-term survival pilot study. *Urology*. 2002; 60(1):170-5.
35. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; 54(5):631-51. Review.
36. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine. State of the art and future challenges *International journal of nanomedicine* 2007; 2(2):129-41.

37. Yuan F. Transvascular drug delivery in solid tumors. *Semin Radiat Oncol.* 1998; 8(3):164-75.
38. Paciotti GF, Myer L, Weinreich D. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv* 2004; 11:169-83.
39. Faraday M. Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos. Trans. R. Soc. London* 1857; 14:145–181.
40. Chandler J, Robinson N, Whiting K. Handling false signals in gold-based tests. *I.V.D. Technol.* 2001; 72:34–35.
41. Root SW, Andrews GA, Knieseley RM, Tyor MP. The distribution and radiation effects of intravenously administered colloidal Au 198 in man. *Cancer* 1954; 7:856–866.
42. Rubin P, Levitt SH. The response of disseminated reticulum cell sarcoma to the intravenous injection of colloidal radioactive gold. *J. Nuclear Med.* 1964; 5:581–594.
43. Weinreich DM, Puhlmann M, Turner EM, Paciotti GF, Tamarkin L, Alexander HR, Jr. Antitumor efficacy and safety of tumor necrosis factor (TNF) bound to colloidal gold (cAU) microspheres in mice. In: SO 55th Annual Cancer Symposium, 2003; S44 (Abstract #P14).
44. Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-a in cancer. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:573–80.
45. Furman WI, Strother D, McClain K, Bell B, Leventhol B, Pratt CB. Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor in children with refractory solid tumors. A pediatric oncology group study. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11:2205–2210.

46. Hui-ming J, Qing-hang L, Xiang C, Zhao-hui W, Guo-ping Z, Ming Z et al. Dysfunction of microvascular endothelial cells induced by tumor necrosis factor (TNF α). Cellular and molecular mechanism. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2000; 23:109–112.
47. Farma JM, Puhlmann M, Soriano PA, Cox D, Paciotti GF, Tamarkin L et al. Direct evidence for rapid and selective induction of tumor neovascular permeability by tumor necrosis factor and a novel derivative, colloidal gold bound tumor necrosis factor. *Int J Cancer*. 2007; 120(11):2474-80.
48. Paciotti, GF, Kingston DGI, Tamarkin L. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors *Drug Dev. Res.* 2006; 67:47-54.
49. Visaria RK, Griffin RJ, Williams BW, Ebbini ES, Paciotti GF, Song CW et al. Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor- α delivery. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(4):1014-20.
50. Visaria R, Bischof JC, Loren M, Williams B, Ebbini E, Paciotti G et al. Nanotherapeutics for enhancing thermal therapy of cancer. *Int J Hyperthermia.* 2007; 23(6):501-11.
51. Gervais DA, McGovern FJ, Arellano RS, McDougal WS, Mueller PR. Renal cell carcinoma. clinical experience and technical success with radio-frequency ablation of 42 tumors. *Radiology* 2003; 226:417-24.
52. Farrell MA, Charboneau WJ, DiMarco DS, Chow GK, Zincke H, Callstrom MR et al. Imaging-guided radiofrequency ablation of solid renal tumors. *AJR Am J Roentgenol.* 2003; 180(6):1509-13.

53. Rehman J, Landman J, Lee D, Venkatesh R, Bostwick DG, Sundaram C et al. Needle-based ablation of renal parenchyma using microwave, cryoablation, impedance- and temperature-based monopolar and bipolar radiofrequency, and liquid and gel chemoablation: laboratory studies and review of the literature. *J Endourol.* 2004; 18(1):83-104. Review.
54. Pavlovich CP, Walther MM, Choyke PL. Percutaneous radio frequency ablation of small renal tumors: initial results. *J Urol.* 2002; 167(1):10–15.
55. Levinson AW, Su LM, Agarwal D, Sroka M, Jarrett TW, Kavoussi LR ET al. Long-term oncological and overall outcomes of percutaneous radio frequency ablation in high risk surgical patients with a solitary small renal mass. *J Urol.* 2008; 180(2):499-504.
56. Deane LA, Clayman RV. Review of minimally invasive renal therapies. Needle-based and extracorporeal. *Urology.* 2006; 68(1 Suppl):26-37. Review.
57. Duchene DA, Lotan Y, Cadeddu JA, Sagalowsky AI, Koeneman KS. Histopathology of surgically managed renal tumors: analysis of a contemporary series. *Urology* 2003; 62:827-30.
58. Tailly T, Goeman L, Blyweert W, Gontero P, Joyce A. Kidney radiofrequency ablation for small renal tumors: oncologic efficacy. *Joniau S, J Endourol.* 2010; 24(5):721-8.
59. Tracy CR, Raman JD, Donnally C, Trimmer CK, Cadeddu JA. Durable oncologic outcomes after radiofrequency ablation: experience from treating 243 small renal masses over 7.5 years. *Cancer.* 2010; 116(13):3135-42.

60. Corwin TS, Lindberg G, Traxer O, Gettman MT, Smith TG, Pearle MS et al. Laparoscopic radiofrequency thermal ablation of renal tissue with and without hilar occlusion. *J Urol*. 2001; 166(1):281-284.
61. Hines-Peralta A, Sukhatme V, Regan M, Signoretti S, Liu ZJ, Goldberg SN. Improved tumor destruction with arsenic trioxide and radiofrequency ablation in three animal models. *Radiology*. 2006; 240(1):82-9. Epub 2006 May 23.
62. Hakimé A, Hines-Peralta A, et al. Combination of radiofrequency ablation with antiangiogenic therapy for tumor ablation efficacy: study in mice. *Radiology*. 2007; 244(2):464-470.
63. Zhou Q, Sun X, Zeng L, Liu J, Zhang Z. A randomized multicenter phase II clinical trial of mitoxantrone-loaded nanoparticles in the treatment of 108 patients with unresected hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine*. 2009; 5(4):419-23.
64. Reynolds C, Barrera D, Jotte R, Spira AI. Phase II trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in first-line patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009; 4(12):1537-43.
65. Chien AJ, Illi JA, Ko AH, Korn WM. A phase I study of a 2-day lapatinib chemosensitization pulse preceding nanoparticle albumin-bound Paclitaxel for advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(17):5569-75.
66. Libutti SK, Paciotti GF, Myer L, Haynes R, Gannon WE, Eugeni M et al. Preliminary results of a phase I clinical trial of CYT-6091: A pegylated colloidal gold-TNF

nanomedicine *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 25, No 18S (June 20 Supplement), 2007: 3603

67. Libutti SK, Paciotti GF, Myer L, Haynes R, Gannon WE, Eugeni M et al. Results of a completed phase I clinical trial of CYT-6091: A pegylated colloidal gold-TNF nanomedicine ASCO Meeting Abstracts 2009; 27: 3586
68. North RJ, Havell EA. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF) II. Analysis of the role of endogenous TNF in endotoxin-induced hemorrhagic necrosis and regression of an established sarcoma. *J. Exp. Med.* 1988; 167:1086–99.
69. Goel R, Swanlund D, Coad J, Paciotti GF, Bischof JC. TNF-alpha-based accentuation in cryoinjury--dose, delivery, and response. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(7):2039-47.
70. Goel R, Shah N, Visaria R, Paciotti GF, Bischof JC. Biodistribution of TNF-alpha-coated gold nanoparticles in an in vivo model system. *Nanomedicine (Lond).* 2009; 4(4):401-10.
71. Jiang J, Bischof J. Effect of timing, dose and interstitial versus nanoparticle delivery of tumor necrosis factor alpha in combinatorial adjuvant cryosurgery treatment of ELT-3 uterine fibroid tumor. *Cryo Letters.* 2010; 31(1):50-62.

Campinas, 20 de Outubro 2010

Elsevier Ltd

PO Box 800

Oxford OX5 1DX

UK

This is to request for COPYRIGHT release of the following article published in Urology for purpose of including in my Ph.D thesis dissertation:

“Use of tumor necrosis factor-alpha-coated gold nanoparticles to enhance radiofrequency ablation in a translational model of renal tumors.” Pedro RN, Thekke-Adiyat T, Goel R, Sheno M, Slaton J, Schmechel S, Bischof J, Anderson JK. Urology. 2010 Aug;76(2):494-8. Epub 2010 May 8.

This thesis is for academic use only and it is not going to be used for commercial, advertising or promotion purposes. I am planning in making 10 (ten) copies of my thesis. One of these copies will be displayed in The University (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil) library. In addition, an electronic version of the thesis will be made available at the University Thesis Database.

I thank you very much in advance. Sincerely,

Renato Nardi Pedro

Dept. Urologia – FCM- UNICAMP