

Trabalho

Título em Português:	ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM RADIOTERAPIA EM MODELO DE MELANOMA EM CAMUNDONGOS
Título em Inglês:	ASSOCIATION OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH RADIOTHERAPY IN A MOUSE MELANOMA MODEL
Autor:	João Henrique Eleutério
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Vanderlei Salvador Bagnato
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Radiologia e Fotobiologia
Agência Financiadora:	Outros



ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM RADIOTERAPIA EM MODELO DE MELANOMA EM CAMUNDONGOS

João Henrique Eleutério

Dra. Mirian Denise Stringasci de Azevedo; Me. Raphael Guimarães
Lopes

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Instituto de Física de São Carlos/Universidade de São Paulo

joaoeleuterio2606@usp.br

Objetivos

O objetivo deste estudo é estabelecer um modelo experimental de melanoma murino (B16F10) em camundongos nude para avaliação da radioterapia (RT) e da terapia fotodinâmica (TFD), isoladas e em combinação. A partir da definição de protocolos de subdose, busca-se analisar os efeitos no crescimento tumoral, nos processos inflamatórios e necróticos, bem como no acúmulo de fotossensibilizador no tecido. Com isso, pretende-se identificar potenciais efeitos aditivos ou sinérgicos entre RT e TFD, fornecendo subsídios para estratégias mais eficazes de tratamento em tumores resistentes.

Métodos e Procedimentos

Foram utilizados camundongos balb/c nude, com aproximadamente seis semanas e peso médio de 25 g. O modelo de melanoma foi estabelecido por inoculação intradérmica de 50 μ L contendo 1×10^6 células B16F10 ressuspensas em solução salina no flanco direito dos animais. O crescimento tumoral foi acompanhado por medidas com paquímetro digital até que as lesões atingissem volumes entre 20 e 30 mm^3 , quando então foram submetidas aos protocolos de tratamento. A RT foi realizada com o equipamento XRAD 225x, operando a 225 kV e 13,3 mA, com dose única

de 10 Gy aplicada diretamente sobre a região tumoral.

Para a TFD, empregou-se o ácido aminolevulínico (ALA), precursor da protoporfirina IX (PpIX), administrado por via intraperitoneal na dose de 120 mg/kg, com duas horas de incubação antes da aplicação da luz. A irradiação foi realizada com o sistema de LEDs LINCE, emitindo em 635 nm, com irradiância de 100 mW/cm^2 e fluência de 60 J/cm^2 . O acúmulo do fotossensibilizador (FS) foi avaliado por espectroscopia de fluorescência, utilizando laser de 408 nm acoplado a fibra óptica "Y" e espectrofotômetro USB2000. Foram obtidas medidas em cinco pontos dentro e cinco pontos nas bordas de cada tumor (20 espectros por condição). A seletividade foi analisada pela razão entre os picos em 635 nm (PpIX) e 500 nm (autofluorescência da pele).

Resultados

O crescimento tumoral nos grupos controle e tratados foi acompanhado diariamente. A RT com 10 Gy reduziu a taxa de crescimento, mas não eliminou os tumores, configurando-se como protocolo de subdose.

Nos ensaios com o uso de ALA gerou necrose superficial e crostas em 72h, mas não impediu a progressão tumoral em longo prazo.

Nas combinações, a RT aplicada antes da TFD apresentou resultados semelhantes ou

superiores à RT isolada, enquanto protocolos invertidos (TFD antes da RT), aceleraram o crescimento tumoral (Figura 1). O acompanhamento das lesões evidenciou necrose parcial e formação de crostas, caracterizando um protocolo subletal adequado para associação à RT e avaliação de efeitos aditivos ou sinérgicos.

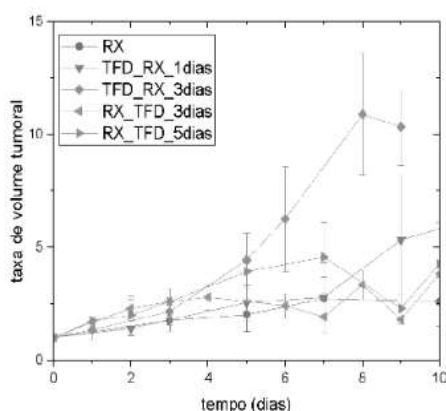


Figura 1: Curvas normalizadas de crescimento tumoral após tratamentos.

As análises de espectroscopia revelaram maior acúmulo de fotossensibilizador nos tumores, exceto após RT, quando o sinal diminuiu, indicando padrões distintos de necrose e distribuição de PpIX.

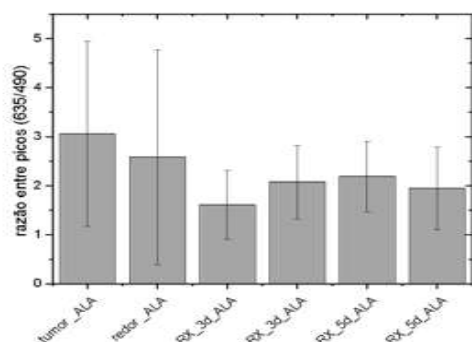


Figura 2: Razões de intensidade de fluorescência entre picos correspondentes às fluorescências da PpIX e da autofluorescência da pele, para diferentes regiões, dentro e ao redor do tumor, e para os diferentes protocolos de tratamento.

Para a progressão do estudo, cortes histológicos e imagens confocais estão em análises, a fim de confirmar tais resultados.

Conclusões

Os resultados demonstram que a RT em dose subletal reduz, mas não elimina o crescimento tumoral, enquanto a terapia fotodinâmica com ALA provoca danos superficiais sem impedir a progressão. A combinação dos métodos mostrou efeitos variáveis, com melhores respostas quando a RT precedeu a TFD. Esses resultados reforçam o potencial do uso combinado das técnicas e destacam a importância da ordem de aplicação das terapias. Apesar da necessidade de ajustes no protocolo e de análises adicionais para otimizar a eficácia antitumoral, os achados se mostram promissores.

O autor e colaboradores declaram não haver conflito de interesses e aprovaram a versão final do resumo.

Referências

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. **Current Cancer Epidemiology. Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 4, p. 217–222, 1 dez. 2019. HANNA, PHARMD, BCPS, BCOP, K.; MAYDEN, MSN, FNP, AOCNP, K; Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. **Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. Int J Med Sci.** 2012;9(3):193-199. doi:10.7150/ijms.3635; Grecco C, Buzzá HH, Stringasci MD, et al. **Single LED-based device to perform widefield fluorescence imaging and photodynamic therapy. SPIE Proc.**2015; 9531:953121:1–10; doi:10.1117/12.2185925; Lim YJ, Jeon S-R, Koh JM, Wu H-G. **Tumor Growth Suppression and Enhanced Radioresponse by an Exogenous Epidermal Growth Factor in Mouse Xenograft Models with A431 Cells. Cancer Res Treat.** 2015;47(4):921-930. doi:10.4143/crt.2014.153



ASSOCIATION OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH RADIOTHERAPY IN A MOUSE MELANOMA MODEL

João Henrique Eleutério

Dra. Mirian Denise Stringasci de Azevedo; M.Sc Raphael Guimarães
Lopes

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Institute of Physics of Sao Carlos / University of Sao Paulo

joaoeleuterio2606@usp.br

Objectives

The objective of this study is to establish an experimental murine melanoma model (B16F10) in nude mice for the evaluation of radiotherapy (RT) and photodynamic therapy (PDT), both individually and in combination. By defining sub-dose protocols, the study seeks to analyze the effects on tumor growth, inflammatory and necrotic processes, as well as on photosensitizer accumulation in the tissue. The goal is to identify potential additive or synergistic effects between RT and PDT, providing support for more effective treatment strategies in resistant tumors.

Materials and Methods

BALB/c nude mice, approximately six weeks old and weighing an average of 25 g, were used. The melanoma model was established by intradermal inoculation of 50 μ L containing 1×10^6 B16F10 cells resuspended in saline into the right flank of the animals. Tumor growth was monitored using digital caliper measurements until lesions reached volumes between 20 and 30 mm^3 , at which point treatment protocols were applied.

Radiotherapy (RT) was performed using the XRAD 225x equipment, operating at 225 kV and 13.3 mA, with a single dose of 10 Gy applied directly to the tumor region.

For photodynamic therapy (PDT), aminolevulinic acid (ALA), a precursor of protoporphyrin IX (PpIX), was administered intraperitoneally at a dose of 120 mg/kg, with a two-hour incubation period prior to light exposure. Irradiation was carried out using the LINCE LED system, emitting at 635 nm, with an irradiance of 100 mW/cm^2 and a fluence of 60 J/cm^2 .

Photosensitizer (PS) accumulation was evaluated by fluorescence spectroscopy, using a 408 nm laser coupled to a "Y"-type optical fiber and a USB2000 spectrophotometer. Measurements were obtained at five points within and five points at the edges of each tumor (20 spectra per condition). Selectivity was analyzed by the ratio between the peaks at 635 nm (PpIX) and 500 nm (skin autofluorescence).

Results

Tumor growth in control and treated groups was monitored daily. Radiotherapy (RT) with 10 Gy reduced the growth rate but did not eliminate the tumors, establishing it as a sub-dose protocol.

In experiments using ALA, superficial necrosis and crust formation were observed within 72 hours, but long-term tumor progression was not prevented.

In combination protocols, RT applied before PDT produced results similar to or better than RT alone, whereas inverted protocols (PDT before RT) accelerated tumor growth (Figure 1). Lesion monitoring revealed partial necrosis and crust formation, characterizing a sublethal protocol suitable for combination with RT and for evaluating additive or synergistic effects.

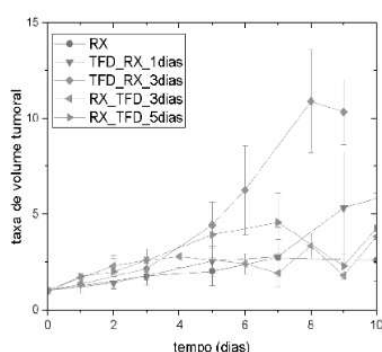


Figure 1: Normalized tumor growth curves following treatments.

Spectroscopic analyses revealed higher photosensitizer accumulation in tumors, except after RT, when the signal decreased, indicating distinct patterns of necrosis and PpIX distribution.

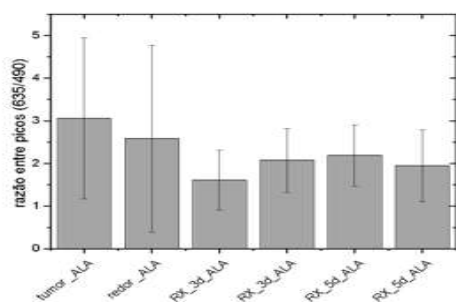


Figure 2: Fluorescence intensity ratios between peaks corresponding to PpIX fluorescence and skin autofluorescence, for different regions within and around the tumor, and for the various treatment protocols.

For the continuation of the study, histological sections and confocal imaging are being analyzed to confirm these results.

Conclusions

The results demonstrate that sublethal-dose radiotherapy (RT) reduces, but does not eliminate, tumor growth, while photodynamic therapy (PDT) with ALA induces superficial damage without preventing progression. The combination of these methods showed variable effects, with better responses when RT preceded PDT. These findings reinforce the potential of combined therapy and highlight the importance of treatment sequence. Although further protocol adjustments and analyses are needed to optimize antitumor efficacy, the results are promising. The author and collaborators declare no conflict of interest and approved the final version of the abstract.

References

- MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. **Current Cancer Epidemiology. Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 4, p. 217–222, 1 dez. 2019.
- HANNA, PHARMD, BCPS, BCOP, K.; MAYDEN, MSN, FNP, AOCNP, K; Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. **Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions**. *Int J Med Sci*. 2012;9(3):193-199. doi:10.7150/ijms.3635;
- Grecco C, Buzzá HH, Stringasci MD, et al. **Single LED-based device to perform widefield fluorescence imaging and photodynamic therapy**. *SPIE Proc*.2015;9531:953121:1–10; doi:10.1117/12.2185925; Lim YJ, Jeon S-R, Koh JM, Wu H-G. **Tumor Growth Suppression and Enhanced Radioresponse by an Exogenous Epidermal Growth Factor in Mouse Xenograft Models with A431 Cells**. *Cancer Res Treat*. 2015;47(4):921-930. doi:10.4143/crt.2014.153