

Trabalho

Título em Português: Avaliação da resposta fototérmica com e sem agentes clareadores no tratamento do melanoma cutâneo

Título em Inglês: Evaluation of photothermal therapy with and without optical clearing agents for the treatment of cutaneous melanoma

Autor: Helena Maria Soraggi Cazzaniga

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Cristina Kurachi

Área de Pesquisa / SubÁrea: Radiologia e Fotobiologia

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FOTOTÉRMICA COM E SEM AGENTES CLAREADORES NO TRATAMENTO DO MELANOMA CUTÂNEO

Helena Maria Soraggi Cazzaniga

Letícia Palombo Martinelli, Gabriel Oliveira Jasinevicius

Cristina Kurachi

Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

helenacassaniga@usp.br

Objetivos

Este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a eficácia da terapia fototérmica (TFT) no tratamento do melanoma cutâneo com e sem o uso de agentes de clareamento óptico (OCAs). Ao comparar os resultados da TFT na presença e ausência de OCAs *in vivo*, buscamos determinar se a aplicação desses agentes pode melhorar a eficácia terapêutica da TFT. O estudo envolverá uma análise da resposta fototérmica, incluindo a avaliação da penetração da luz, distribuição do calor e o dano celular subsequente nos tecidos do melanoma.

Métodos e Procedimentos

1. Protocolo *In Vitro*

- 1.1. Cultura Celular:** Linhagem B16F10 de melanoma é cultivada em DMEM com 10% FBS e 5% antibiótico, a 37°C com 5% CO₂. Utilizam-se dois fenótipos com diferentes produções de melanina.
- 1.2. Preparação:** Células são cultivadas até 95% de confluência, contadas com câmara de Neubauer, centrifugadas e ressuspensas em soro estéril para implantação em animais, com 30 µL por camundongo.

2. Protocolo *In Vivo*

- 2.1. Indução:** Camundongos fêmeas BALB/c Nude, com 6 semanas e 15 gramas, são utilizados. São implantadas 10⁶ células de melanoma intradermicamente para formar tumores sólidos. Os tumores são monitorados quanto ao crescimento e estresse.
- 2.2. Tratamento:**
 - 2.2.1. Anestesia:** Os camundongos são anestesiados com isoflurano durante todo o procedimento.
 - 2.2.2. Agentes Fototérmicos:** Utiliza-se nanoemulsão de indocianina verde dimérica (nano-dICG) a 200 µM, administrada intratumoralmente.
 - 2.2.3. Clareamento Óptico:** Aplicação de mistura PEG-400 e 1,2 propanodiol no tumor, massageada por 15 minutos para melhorar a penetração da luz.
 - 2.2.4. Irradiação:** Luz de laser a 808nm, com irradiância de 0,5 W/cm² por 10 minutos.
 - 2.2.5. Grupos Experimentais:** Incluem "luz", "OCA + luz", "nano-dICG + luz", e "nano-dICG + OCA + luz", cada um com 3 camundongos para comparação.
- 2.3. Avaliação:**
 - 2.3.1. Resposta Fototérmica:** Medida por câmera termográfica a cada 40 segundos.
 - 2.3.2. Crescimento Tumoral:** Monitorado por medidas regulares do volume tumoral.

Resultados

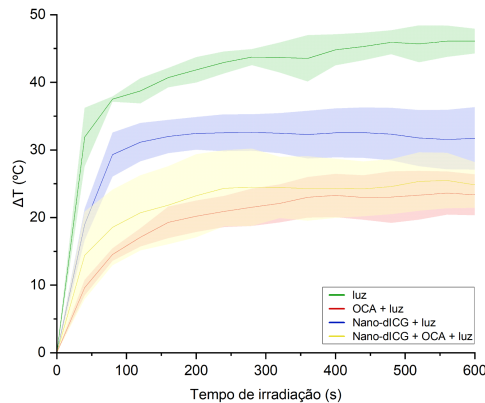


Figura 1: Gráfico da variação de temperatura em função do tempo de irradiação de tumores com **alta** síntese de melanina.

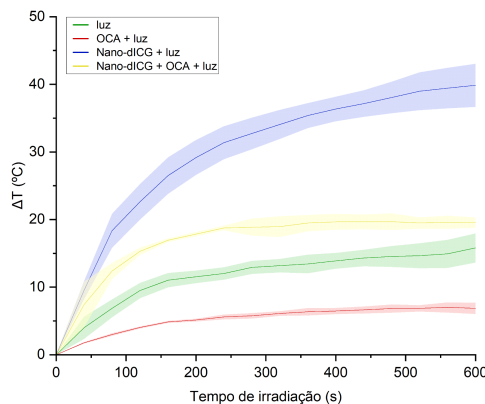


Figura 2: Gráfico da variação de temperatura em função do tempo de irradiação de tumores com **baixa** síntese de melanina.

Conclusões

Os resultados mostram que tumores mais pigmentados, que contêm altos níveis de melanina, tiveram piores resultados com tratamentos que utilizam OCAs e o maior aquecimento com a irradiação apenas. Isso sugere que a presença de OCAs prejudica ou a absorção da energia luminosa ou a conversão da energia luminosa em calor.

Em contraste, para melanomas com menos melanina, a utilização de nano-dICG foi mais eficaz, pois esse agente fototérmico substitui a melanina na absorção de luz e conversão em calor.

A combinação "OCA + luz" teve o pior desempenho em ambos os casos, pois, apesar dos OCAs melhorarem a penetração da luz, eles diminuem o aumento da temperatura no tumor, reduzindo a eficácia do tratamento fototérmico e evitando a morte celular desejada.

Agradecimentos



Referências

- I. Martinelli, L. P., Iermak, I., Moriyama, L. T., Requena, M. B., Pires, L., & Kurachi, C. (2020). Agente de clareamento óptico aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em um modelo murino de melanoma cutâneo: uma análise por microspectroscopia Raman. *Biomedical Optics Express*, vol. 11, nº 11, pp. 6516-6527. doi:10.1364/BOE.405039
- II. Pires, L., Demidov, V., Wilson, B. C., Salvio, A. G., Moriyama, L., Bagnato, V. S., Vitkin, A., & Kurachi, C. (2020). Terapia Fotodinâmica com Dois Agentes e Clareamento Óptico Erradica Melanoma Pigmentado em Modelos Tumoriais Pré-clínicos. *Journals, Cancers*, vol. 12, nº 7. doi:10.3390/cancers12071956
- III. Kwon, N., Jasinevicius, G. O., Kassab, G., Ding, L., Bu, J., Martinelli, L. P., Ferreira, V. G., Dhaliwal, A., Chan, H. H. L., Mo, Y., Bagnato, V. S., Kurachi, C., Chen, J., Zheng, G., & Buzzá, H. H. (2023). Dimerização de Indocianina Verde Induzida por Nanoestruturas Gera Nanopartículas Fototérmicas Ultra-Estáveis. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 62, nº 28. doi:10.1002/anie.202305564

EVALUATION OF PHOTOTHERMAL THERAPY WITH AND WITHOUT OPTICAL CLEARING AGENTS FOR THE TREATMENT OF CUTANEOUS MELANOMA

Helena Maria Soraggi Cazzaniga

Letícia Palombo Martinelli, Gabriel Oliveira Jasinevicius

Cristina Kurachi

São Carlos' Institute of Physics - University of São Paulo

helenacassaniga@usp.br

Objectives

This research project aims to evaluate the efficacy of photothermal therapy (PTT) in the treatment of cutaneous melanoma with and without the use of optical clearing agents (OCAs). By comparing the results of PTT in the presence and absence of OCAs in vivo, we seek to determine whether the application of these agents can enhance the therapeutic effectiveness of PTT. The study will involve an analysis of the photothermal response, including the assessment of light penetration, heat distribution, and subsequent cellular damage in melanoma tissues.

Methods and Procedures

1. *In Vitro* Protocol

- 1.1. Cell Culture:** The B16F10 melanoma cell line is cultured in DMEM with 10% FBS and 5% antibiotic, at 37°C with 5% CO₂. Two phenotypes with different melanin production levels are used.
- 1.2. Preparation:** Cells are cultured until 95% confluence, counted using a Neubauer chamber, centrifuged, and resuspended in sterile serum for implantation into animals, with 30 µL per mouse.

2. *In Vivo* Protocol

- 2.1. Induction:** Female BALB/c Nude mice, 6 weeks old and weighing 15 grams, are used. 10⁶ melanoma cells are implanted intradermally to form solid tumors. Tumors are monitored for growth and stress.
- 2.2. Treatment:**
 - 2.2.1. Anesthesia:** Mice are anesthetized with isoflurane throughout the procedure.
 - 2.2.2. Photothermal Agents:** A dimeric indocyanine green nanoemulsion (nano-dICG) at 200 µM is administered intratumorally.
 - 2.2.3. Optical Clearing:** A mixture of PEG-400 and 1,2-propanediol is applied to the tumor and massaged for 15 minutes to enhance light penetration.
 - 2.2.4. Irradiation:** Laser light at 808 nm, with an irradiance of 0.5 W/cm² for 10 minutes.
 - 2.2.5. Experimental Groups:** Include 'light,' 'OCA + light,' 'nano-dICG + light,' and 'nano-dICG + OCA + light,' with 3 mice in each group for comparison.
- 2.3. Evaluation:**
 - 2.3.1. Photothermal Response:** Measured by a thermal camera every 40 seconds.
 - 2.3.2. Tumor Growth:** Monitored by regular measurements of tumor volume.

Results

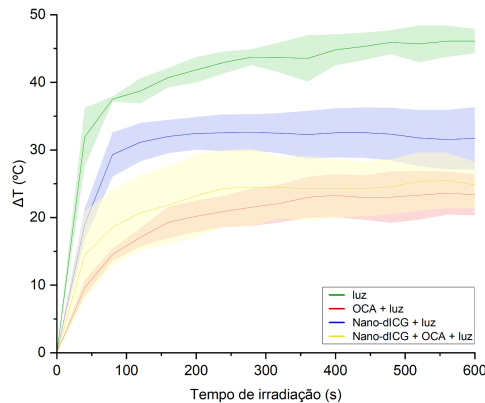


Figure 1: Graph of temperature variation as a function of irradiation time for tumors with **high** melanin synthesis.

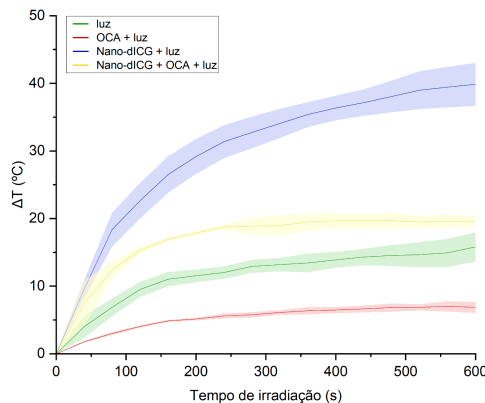


Figure 2: Graph of temperature variation as a function of irradiation time for tumors with **low** melanin synthesis.

Conclusions

The results show that more pigmented tumors, which contain high levels of melanin, had poorer outcomes with treatments using OCAs and with irradiation alone. This suggests that the presence of OCAs either hinders the absorption of light energy or the conversion of light energy into heat.

In contrast, for melanomas with lower melanin content, the use of nano-dICG was more effective, as this photothermal agent replaces melanin in light absorption and conversion to heat.

The 'OCA + light' combination performed the worst in both cases. Although OCAs improved light penetration, they reduced the temperature increase in the tumor, thereby diminishing the effectiveness of the photothermal treatment and preventing the desired cellular destruction.

Acknowledgments



References

- I. Martinelli, L. P., Iermak, I., Moriyama, L. T., Requena, M. B., Pires, L., & Kurachi, C. (2020). Optical clearing agent increases effectiveness of photodynamic therapy in a mouse model of cutaneous melanoma: an analysis by Raman microspectroscopy. *Biomedical Optics Express*, vol. 11, issue 11, pp. 6516-6527. doi:10.1364/BOE.405039
- II. Pires, L., Demidov, V., Wilson, B. C., Salvio, A. G., Moriyama, L., Bagnato, V. S., Vitkin, A., & Kurachi, C. (2020). Dual-Agent Photodynamic Therapy with Optical Clearing Eradicates Pigmented Melanoma in Preclinical Tumor Models. *Journals, Cancers*, vol. 12, issue 7. doi:10.3390/cancers12071956
- III. Kwon, N., Jasinevicius, G. O., Kassab, G., Ding, L., Bu, J., Martinelli, L. P., Ferreira, V. G., Dhaliwal, A., Chan, H. H. L., Mo, Y., Bagnato, V. S., Kurachi, C., Chen, J., Zheng, G., & Buzzá, H. H. (2023). Nanostructure-Driven Indocyanine Green Dimerization Generates Ultra- Stable Phototheranostics Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 62, issue 28. doi:10.1002/anie.202305564