

Título em Português: DETECÇÃO DE METÁSTASE UTILIZANDO IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA E INDOCIANINA VERDE:
ESTUDO IN VIVO

Título em Inglês: DETECTION OF METASTASIS USING FLUORESCENCE IMAGING AND INDOCYANINE GREEN: IN VIVO
STUDY

Autor: João Henrique Eleutério

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Vanderlei Salvador Bagnato



DETECÇÃO DE METÁSTASE UTILIZANDO IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA E INDOCIANINA VERDE: ESTUDO IN VIVO

João Henrique Eleutério

Dra. Mirian Denise Stringasci de Azevedo

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Instituto de São Carlos/Universidade de São Paulo

joaoeleuterio2606@usp.br

Objetivos

O objetivo deste estudo é estabelecer um modelo eficaz para rastreamento e tumoral de metástase utilizando a linhagem tumoral 4T1 de câncer de mama em camundongos. Utilizando imagens de fluorescência e o marcador ICG (indocianina verde), o estudo realiza o rastreamento de possíveis metástases tumorais, contribuindo para a identificação e análise das regiões afetadas, com a expectativa de fornecer uma base sólida para futuras pesquisas e ferramenta de monitoramento de estratégias terapêuticas para o câncer.

Métodos e Procedimentos

No estudo, a linhagem celular 4T1 (CRL-2539) é utilizada, com as células armazenadas em nitrogênio líquido até o momento de descongelamento e cultivo em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. O cultivo é mantido a 37°C em uma incubadora com 5% de CO₂. Posteriormente, as células são tripsinizadas, contadas com auxílio de câmara de Neubauer e corante azul de tripan, e aquelas com viabilidade acima de 80% serão injetadas em

camundongos para estabelecer o modelo tumoral.

O estudo utilizou 10 camundongos balb/c nude, mantidos em ambiente controlado e alimentados ad libitum. As células 4T1 foram injetadas subcutaneamente na mama inferior esquerda dos camundongos, que foram monitorados diariamente quanto à instalação do tumor. O acompanhamento do tumor foi realizado por medição com paquímetro digital. O objetivo é detectar metástases com imagens capturadas por um sistema protótipo de fluorescência, composto por lasers de diodo com excitação em 780 nm, componentes ópticos para detecção de fluorescência em 810 nm, duas câmeras acopladas a um computador com software próprio para coleta e processamento de imagem. Foi utilizado 0,015 mg de ICG por camundongo dissolvido em 50 µL de água para injeção e administrado via veia caudal (dando uma dose de 0,5 mg/kg de massa de animal) e tempo de incubação de 1h.

Resultados

Os resultados obtidos no modelo de carcinoma de mama, utilizando a linha celular 4T1, demonstraram um crescimento tumoral

continuo ao longo dos 35 dias de acompanhamento. Durante o experimento, os animais eutanasiados com 21 dias de crescimento tumoral não apresentaram focos de metástase visíveis, enquanto os eutanasiados com 28 dias já exibiam sinais claros de metástase. Este achado confirma que o período de 28 dias é crucial para a manifestação de metástases visíveis no modelo utilizado.

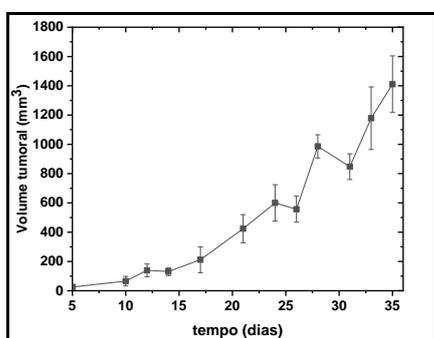


Figura 1. Crescimento do volume tumoral após indução do carcinoma mamário murinho.

Conseguimos, a partir de imagem de fluorescência e uso de ICG como marcador, detectar uma metástase de um tumor de cerca de 1mm³ localizado próximo à axila do animal. Essa descoberta marca um avanço importante em nosso estudo, trazendo novas perspectivas para detecção e monitoramento da doença.

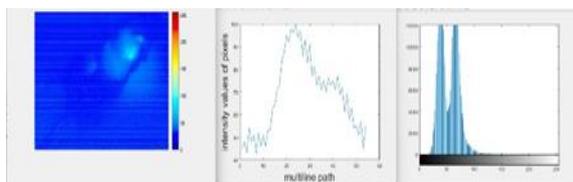


Figura 2. Exemplo de foco de metástase tumoral observado a partir do protocolo de ICG.

Conclusões

Este estudo avançou significativamente na criação de um modelo experimental para a análise de metástase em câncer de mama utilizando a linhagem celular 4T1 em camundongos. A observação ao longo de 35 dias permitiu identificar o 28^o dia como um

ponto crítico para o aparecimento de metástases visíveis, fornecendo uma base sólida para futuras análises. Um dos resultados mais notáveis foi a detecção de metástase imagem de fluorescência e uso de ICG como marcador, o que representa um avanço incrível em relação ao que buscávamos. O próximo passo será otimizar as condições de imageamento. Isso permitirá aprofundar a compreensão da cronologia da disseminação tumoral e fornecerá subsídios para futuras pesquisas terapêuticas focadas no diagnóstico e monitoramento do câncer metastático.

Agradecimentos

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos que contribuem para a realização deste estudo. Primeiramente, agradeço à minha coorientadora Dr. Mirian pelo constante apoio, orientação e incentivo ao longo deste projeto. Sou grato ao grupo de óptica "Milton Ferreira" e ao Instituto de Física de São Carlos pelo suporte técnico essencial. Finalmente, agradeço à todos pelo apoio incondicional durante o processo. Sem a contribuição de cada um de vocês, este trabalho não estaria acontecendo.

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. **Chemotherapy Treatment Considerations in Metastatic Breast Cancer**. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, v. 12, n. 2, 1 mar. 2021.
- Govone AB, Gómez-García PA, Carvalho AL, Capuzzo R de C, Magalhães DV, Kurachi C. **Portable widefield imaging device for ICG-detection of the sentinel lymph node**. In: Kurachi C, Svanberg K, Tromberg BJ, Bagnato VS, eds. ; 2015:95312D. doi:10.1117/12.2181025



DETECTION OF METASTASIS USING FLUORESCENCE IMAGING AND INDOCYANINE GREEN: IN VIVO STUDY

João Henrique Eleutério

Dr. Mirian Denise Stringasci de Azevedo

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 effective model for tumor metastasis tracking using the 4T1 breast cancer cell line in mice. By employing fluorescence imaging and the ICG (indocyanine green) marker, the study aims to track potential tumor metastases, contributing to the identification and analysis of affected regions. The goal is to provide a solid foundation for future research and a tool for monitoring therapeutic strategies for cancer.

Materials and Methods

In the study, the 4T1 cell line (CRL-2539) was used, with the cells stored in liquid nitrogen until thawing and cultivation in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The culture was maintained at 37°C in an incubator with 5% CO₂. Subsequently, the cells were trypsinized, counted using a Neubauer chamber and trypan blue dye, and those with viability above 80% were injected into mice to establish the tumor model.

The study utilized 10 balb/c nude mice, kept in a controlled environment and fed ad libitum. The 4T1 cells were injected subcutaneously into the lower left mammary gland of the mice, which were monitored daily for tumor development. Tumor monitoring was performed

by measurement with a digital caliper. The goal was to detect metastases using images captured by a prototype fluorescence system, composed of diode lasers with excitation at 780 nm, optical components for fluorescence detection at 810 nm, and two cameras connected to a computer with proprietary software for image collection and processing. A dose of 0.015 mg of ICG per mouse was used, dissolved in 50 µL of water for injection, and administered via the tail vein (resulting in a dose of 0.5 mg/kg of animal body weight) with an incubation time of 1 hour.

Results

The results obtained in the breast carcinoma model using the 4T1 cell line demonstrated continuous tumor growth over the 35-day monitoring period. During the experiment, animals euthanized after 21 days of tumor growth did not present visible metastatic foci, while those euthanized after 28 days already exhibited clear signs of metastasis. This finding confirms that the 28-day period is crucial for the manifestation of visible metastases in the model used.

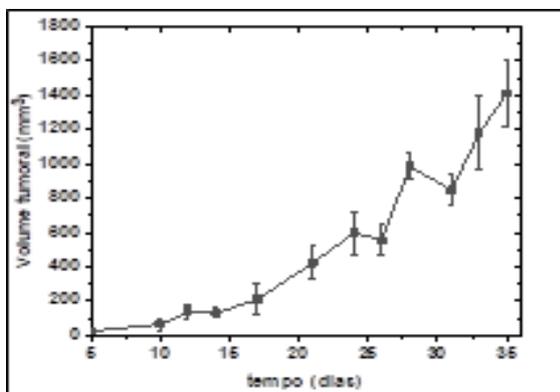


Figure 1. Tumor volume growth after induction of murine mammary carcinoma.

We were able to detect a metastasis from a tumor approximately 1mm³ in size located near the animal's axilla using fluorescence imaging and ICG as a marker. This discovery represents a significant advancement in our study, offering new perspectives for the detection and monitoring of the disease.

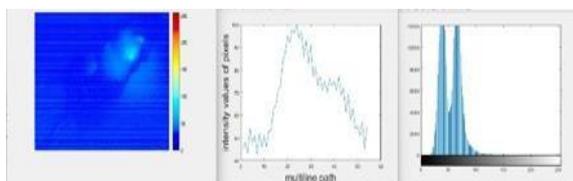


Figure 2. Example of a metastatic tumor focus observed using the ICG protocol.

Conclusions

This study has made significant progress in developing an experimental model for analyzing metastasis in breast cancer using the 4T1 cell line in mice. Observations over 35 days identified the 28th day as a critical point for the appearance of visible metastases, providing a solid foundation for future analyses. One of the most remarkable outcomes was the detection of metastasis through fluorescence imaging and the use of ICG as a marker, representing a significant advancement in our objectives. The

next step will be to optimize the imaging conditions, which will deepen our understanding of the chronology of tumor dissemination and provide valuable insights for future therapeutic research focused on the diagnosis and monitoring of metastatic cancer.

Acknowledgments

I would like to express my gratitude to everyone who contributed to the realization of this study. First and foremost, I thank my co-advisor, Dr. Mirian, for her constant support, guidance, and encouragement throughout this project. I am also grateful to the "Milton Ferreira" optics group and the São Carlos Institute of Physics for their essential technical support. Finally, I extend my thanks to everyone for their unwavering support during this process. Without each of your contributions, this work would not have been possible.

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, PHARM D, BCPS, BCOP, K.; MAYDEN, MSN, FNP, AOCNP, K. **Chemotherapy Treatment Considerations in Metastatic Breast Cancer**. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, v. 12, n. 2, 1 mar. 2021. Govone AB, Gómez-García PA, Carvalho AL, Capuzzo R de C, Magalhães DV, Kurachi C. **Portable widefield imaging device for ICG-detection of the sentinel lymph node**. In: Kurachi C, Svanberg K, Tromberg BJ, Bagnato VS, eds.; 2015:95312D.doi:10.1117/12.2181025