

# Terapia sonodinâmica aplicada ao melanoma cutâneo: um estudo pré-clínico em modelo animal

## Sonodynamic therapy applied to cutaneous melanoma: a preclinical study in an animal model

Erika T. Ponce Ayala<sup>1</sup>, Iago Silva e Carvalho<sup>2</sup>, Camila Aparecida Antunes<sup>1</sup>, Michelle Barreto Requena<sup>2</sup>, Vanderlei Salvador Bagnato<sup>1,2</sup>, Sebastião Pratavieira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Biomédica, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

### Resumo

O melanoma cutâneo é uma das formas mais agressivas e mortais de câncer de pele. A terapia sonodinâmica (TSD) é uma técnica anticâncer alternativa não invasiva baseada na interação do ultrassom de baixa intensidade e uma molécula sonoativa, conhecida como sonossensibilizador (SS) em um meio oxigenado. No entanto, o potencial da TSD para o tratamento do melanoma cutâneo ainda não está amplamente explorado. Este trabalho visou avaliar os efeitos *in vivo* da TSD mediada por ácido 5-aminolevulínico (ALA) sobre o melanoma pigmentado murino intradérmico em estágios iniciais. Para o estabelecimento do modelo tumoral, células de melanoma B16-F10 ( $10^6$  células por animal) foram implantadas intradermicamente no flanco direito de camundongos Nu/J atípicos. Os tumores foram categorizados em dois estágios com base na espessura: estágio 1 (1–1,5 mm) e estágio 2 (2,5–3 mm). Ambos os grupos foram tratados com um protocolo de TSD consistindo em ultrassom de baixa intensidade ( $2 \text{ W/cm}^2$ , 100 Hz, ciclo de trabalho de 50%, durante 30 minutos), aplicado por meio de um guia de onda cônico de alumínio. A espessura e o volume tumoral foram medidos diariamente utilizando ultrassonografia de alta resolução (Sistema Vevo 3100). Três dias após o tratamento, os animais foram eutanasiados e os tumores removidos e processados para análise histológica. Observou-se uma redução significativa no volume tumoral nos grupos dos estágios 1 e 2 tratados com TSD mediada por ALA, em comparação com o grupo controle não tratado. Esses resultados demonstram o potencial terapêutico da TSD para o tratamento do melanoma cutâneo em estágios iniciais. Além disso, o uso do guia de onda cônica mostrou-se vantajoso ao concentrar a energia ultrassônica em áreas tumorais localizadas, limitando de forma eficaz os danos aos tecidos saudáveis adjacentes.

**Palavras-chave** Terapia sonodinâmica; Ácido 5-aminolevulínico; ultrassonografia; melanoma cutâneo; modelo animal.

### Abstract

*Cutaneous melanoma is one of the most aggressive and deadly forms of skin cancer. Sonodynamic therapy (SDT) is a non-invasive alternative anticancer technique based on the interaction between low-intensity ultrasound and a sonoactive molecule, known as a sonosensitizer (SS), in an oxygenated environment. However, the potential of SDT for the treatment of cutaneous melanoma has not yet been widely explored. This study aimed to evaluate the *in vivo* effects of 5-aminolevulinic acid (ALA)-mediated SDT on early-stage intradermal pigmented melanoma in mice. To establish the tumor model, B16-F10 melanoma cells ( $10^6$  cells per animal) were intradermally implanted into the right flank of Nu/J athymic mice. Tumors were categorized into two stages based on thickness: stage 1 (1–1.5 mm) and stage 2 (2.5–3 mm). Both groups were treated using a SDT protocol consisting of low-intensity ultrasound ( $2 \text{ W/cm}^2$ , 100 Hz, 50% duty cycle, 30 minutes) delivered through a conical aluminum waveguide. Tumor thickness and volume were measured daily using high-resolution ultrasound imaging (Vevo 3100 System). Three days after treatment, the animals were euthanized, and the tumors were excised and processed for histological analysis. A significant reduction in tumor volume was observed in both stage 1 and stage 2 groups treated with ALA-mediated SDT, compared to the untreated control group. These findings demonstrate the therapeutic potential of SDT for early-stage cutaneous melanoma. Additionally, the use of a conical waveguide proved beneficial by focusing the ultrasound energy on localized tumor areas, effectively limiting damage to surrounding healthy tissues.*

**Keywords:** Sonodynamic therapy; 5-aminolevulinic acid; ultrasound imaging; cutaneous melanoma; animal model.

### 1. Introdução

O melanoma cutâneo é um câncer de pele altamente invasivo e metastático. A classificação do melanoma é determinada pelo sistema de estadiamento da American Joint Committee on Cancer (AJCC) o qual divide o melanoma em cinco estágios principais, variando de 0 a IV. O melanoma em estágio 0, também conhecido como melanoma *in situ*, está confinado à epiderme, com espessura tumoral inferior a 1 mm. O estágio I é caracterizado por uma espessura tumoral de até 2 mm sem ulceração, enquanto o estágio II envolve espessura superior a 2 mm. Os estágios I e II permanecem localizados na epiderme e derme, sem evidência de

disseminação para linfonodos próximos ou metástase. No estágio III, o melanoma se estende aos linfonodos regionais, mas não afeta órgãos distantes. O estágio IV representa a forma mais avançada da doença, envolvendo metástase distante.(1) A ressecção cirúrgica continua sendo o tratamento padrão para o melanoma cutâneo; no entanto, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou a combinação dessas abordagens também são utilizadas em estágios de maior risco.(2,3) Essas abordagens geralmente alcançam as maiores taxas de sucesso; porém, podem ser subótimas e agressivas para o paciente em algumas situações.(4) Nesse sentido, estratégias terapêuticas alternativas

estão sendo exploradas para combater essa doença, incluindo as terapias dinâmicas, como a terapia sonodinâmica.

Em um ambiente oxigenado, a TSD é um tratamento minimamente invasivo que combina ultrassom de baixa intensidade com moléculas sonoativas, conhecidas como sonossensibilizadores (SS).<sup>(5)</sup> Essa interação induz efeitos sonomecânicos e sonoquímicos, como danos mecânicos às membranas celulares e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), respectivamente.<sup>(6-8)</sup> Esses efeitos são amplamente atribuídos ao fenômeno de cavitação acústica e a sua interação com o SS.<sup>(9,10)</sup> Diversos estudos pré-clínicos demonstraram que a TSD é uma estratégia terapêutica promissora, induzindo eficazmente efeitos citotóxicos em vários tipos de câncer e influenciando a modulação da resposta imune no microambiente tumoral.<sup>(11-15)</sup> Embora os mecanismos de ação por trás da TSD não estão totalmente compreendidos, ensaios clínicos estão em andamento, mostrando um potencial clínico significativo.<sup>(16,17)</sup> No entanto, o tratamento do melanoma cutâneo em estágios iniciais via TSD usando sensibilizadores orgânicos não está amplamente explorado.<sup>(18-22)</sup>

Por outro lado, a TSD carece de métodos padronizados para a irradiação de ultrassom, resultando em uma variabilidade considerável entre os estudos pré-clínicos. Os métodos de irradiação de ultrassom incluem o uso de acoplamentos acústico (e.g., tanques com água, gel, camadas de tecido, tubos ou bolsas preenchidos com água desgaseificada), e guias de onda (e.g., cones metálicos ou preenchidos).<sup>(18-24)</sup> No entanto, os prós e contras de cada abordagem raramente são discutidos, e algumas configurações mostraram-se menos aplicáveis clinicamente. Assim, um desafio fundamental no início deste estudo foi determinar o método mais eficaz para direcionar a irradiação por ultrassom à região-alvo. Para isso, prévio aos procedimentos terapêuticos, foi realizado um mapeamento do campo acústico gerado pela irradiação direta com o ultrassom e pela irradiação com o uso de um guia de onda acoplado ao transdutor. Isto devido a que o desenvolvimento de um protocolo de TSD, com um método de irradiação de ultrassom eficiente e viável, é crucial para o avanço da tradução clínica da TSD.

A Protoporfirina IX (PpIX) é uma porfirina endógena fotoativa amplamente aplicada na terapia fotodinâmica.<sup>(25)</sup> Vários estudos pré-clínicos demonstraram que a PpIX também pode ser ativada por ultrassom, possibilitando seu uso como sonossensibilizador.<sup>(26-28)</sup> Devido ao metabolismo alterado das células tumorais, há aumento da produção e acúmulo de PpIX endógeno em células tumorais; no entanto, os níveis endógenos são insuficientes para o sucesso da TSD. Para aumentar enzimaticamente a concentração de PpIX, administra-se o ácido 5-aminolevulínico (ALA), um precursor da PpIX. Essa abordagem contorna os

mecanismos de retroalimentação negativa da via biossintética do heme, resultando no acúmulo preferencial da PpIX em células tumorais.<sup>(29)</sup> O uso do ALA em terapias dinâmicas é muito conveniente, pois foi aprovado para uso clínico na Europa em 2001 e nos Estados Unidos em 1999 pela FDA.<sup>(30)</sup>

Este trabalho visou avaliar os efeitos *in vivo* da TSD mediada por ácido 5-aminolevulínico (ALA) sobre o melanoma pigmentado murino intradérmico em estágios iniciais. Para o estabelecimento do modelo tumoral, células de melanoma B16-F10 ( $10^6$  células por animal) foram implantadas intradermicamente no flanco direito de camundongos Nu/J atípicos. Os tumores foram categorizados em dois estágios com base na espessura: estágio 1 (1–1,5 mm) e estágio 2 (2,5–3 mm). Ambos os grupos foram tratados com um protocolo de TSD consistindo em ultrassom de baixa intensidade ( $2 \text{ W/cm}^2$ , 100 Hz, ciclo de trabalho de 50%, durante 30 minutos), aplicado por meio de um guia de onda cônicamente de alumínio. A espessura e o volume tumoral foram medidos diariamente utilizando ultrassonografia de alta resolução (Sistema Vevo 3100). Três dias após o tratamento, os animais foram eutanasiados e os tumores removidos e processados para análise histológica.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Equipamentos

O transdutor de área grande (diâmetro: 35 mm, área de radiação efetiva (ERA):  $5 \text{ cm}^2$ ) do dispositivo comercial Sonidel SP100 (Sonidel Limited, Dublin, Irlanda) foi acoplado a um guia de ondas cônicas de alumínio para a irradiação de ultrassom.

### 2.2. Medidas acústicas

O Sistema AIMS III (OndaCorp, EUA) foi utilizado para caracterizar a propagação de ondas ultrassônicas, mapeando o campo de pressão acústica gerado pelo dispositivo ultrassônico. O sistema AIMS III apresenta um tanque de acrílico com dimensões internas de  $0,89 \times 0,51 \times 0,58 \text{ m}$ . Inclui um suporte automatizado de três eixos para posicionamento do hidrofone, um suporte rotativo para o transdutor e um condicionador de água AQUAS-10 (OndaCorp, EUA) que desgaseifica a água. O tanque foi preenchido com água destilada até um nível adequado para a coleta de dados, e a água foi mantida em circulação contínua usando o AQUA-10 durante todas as medições acústicas para garantir que permanecesse desgaseificada. Foi utilizado um hidrofone HNR-Series 1000 (OndaCorp, EUA), com uma faixa de frequência operacional de 0,25 -10 MHz e uma temperatura máxima de operação de 50 °C. Os dados foram coletados utilizando o software Soniq (OndaCorp, Estados Unidos), que funciona em conjunto com o software do osciloscópio PicoScope série 5000C (Pico Technology, Estados Unidos). O osciloscópio fornece a tensão quadrática média ( $V_{rms}$ ), que é então convertida em pressão acústica (Pa) pela equação (1) e o fator de conversão,  $M = 7,07 \times 10^{-7} \text{ V/Pa}$ , fornecido pelo fabricante.

$$\text{Pa} = V_{\text{rms}} / M \quad (1)$$

O perfil de pressão acústica correspondente ao transdutor foi caracterizado pelo mapeamento dos valores de  $V_{\text{rms}}$  ao longo do eixo Z. O perfil correspondente ao transdutor acoplado ao guia de ondas também foi caracterizado. Os perfis para ambos os casos foram plotados utilizando MATLAB (Matlab 2022b, The MathWorks, Inc., Natick, MA, EUA). Para realizar estas medidas acústicas, os parâmetros do ultrassom terapêutico foram definidos como: frequência do ultrassom de 1 MHz, modo de irradiação contínua, e intensidade do ultrassom de 1 W/cm<sup>2</sup>.

### 2.3. Modelo tumoral

Camundongos fêmeas atímidas Nu/J (peso: 20–25 g, idade: 6–8 semanas) foram adquiridos do Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais (IACUC) da Texas A&M University (IACUC 2023-0137). Os camundongos foram mantidos em um ambiente livre de patógenos, com um ciclo de iluminação claro/escuro de 12 horas, e tiveram acesso livre a alimento e água. Após o período de aclimatação de uma semana, 50 µL de solução de células B16-F10 (PBS estéril, 1x10<sup>6</sup> células por animal) foram implantados intradermicamente no flanco direito dos camundongos sob anestesia inalatória (isoflurano a 5% para indução e 2% para manutenção). A implantação intradérmica foi verificada por exame físico, conforme descrito por Carlson *et al.* (31) Em breve, a verificação consistiu no deslocamento lateral da pele após a inoculação celular, sendo a implantação correta indicada pelo movimento simultâneo da solução celular com a pele. Após alguns dias, os tumores estavam visivelmente aderidos à pele e moviam-se livremente com ela, em conformidade com as observações relatadas na ref. 31.

### 2.4. Administração de ALA

O ácido 5-aminolevúlico (ALA) em pó foi fornecido pela EMI Pharma (Projeto Embrapii, São Carlos, SP, Brasil). Ele foi diluído em água de injeção a uma concentração de 100 mg/mL, e o pH foi ajustado para 5,0–6,5 com a adição de hidróxido de sódio 1 N. A solução foi preparada recentemente e utilizada dentro de uma hora após o preparo. A solução de ALA foi administrada por via intraperitoneal a uma concentração de 200 mg/kg de peso corporal animal. Com base nos achados de um estudo anterior, foi selecionado um tempo de incubação de três horas para induzir a acumulação de PpIX nos tumores.(32) Durante esse período, os camundongos foram mantidos em um ambiente escuro.

### 2.5. Grupos experimentais terapêuticos

Quando os tumores atingiram a espessura correspondente ao tumor em estágio 1 (1–1,5 mm), os camundongos foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=4-5): controle, ultrassom e TSD. Da mesma forma, os camundongos foram categorizados em três grupos quando os tumores atingiram a espessura correspondente ao estágio 2 (2,5–3 mm). Os camundongos do grupo controle não receberam nenhum tratamento. No grupo ultrassom, os camundongos foram expostos apenas à irradiação ultrassônica, enquanto no grupo TSD, os camundongos receberam administração de ALA, seguida de irradiação ultrassônica. A irradiação ultrassônica foi conduzida utilizando um guia de ondas cônicos de alumínio feito sob medida, o qual foi acoplado ao transdutor de ultrassom. Uma fina camada de gel foi aplicada entre o guia de ondas e o tumor. A frequência do ultrassom, o modo de irradiação, o ciclo de trabalho, a frequência do pulso, a intensidade do ultrassom e o tempo de sonicação foram ajustados para 1 MHz, modo pulsado, 50%, 100 Hz, 2 W/cm<sup>2</sup> e 30 min, respectivamente. Os animais do grupo ultrassom e TSD foram submetidos a duas sessões de tratamento com intervalo de 24 horas (Dia 1 e 2).

Os camundongos foram submetidos a anestesia geral (5% de isoflurano para indução, 2% para manutenção) durante a irradiação. O aumento da temperatura na região tumoral foi monitorado utilizando uma câmera infravermelha FLUK-Ti400 de 60 Hz (Fluke, EUA). O peso corporal e o volume tumoral foram monitorados diariamente. Os camundongos foram eutanasiados 4 dias após a primeira sessão de tratamento por overdose anestésica, utilizando uma dose máxima de isoflurano (4% em oxigênio). Como método de confirmação da morte, prevê-se a aplicação de deslocamento cervical após a detecção da ausência de sinais vitais. Imediatamente após, os tumores foram retirados para a análise histológica.

### 2.6. Monitoramento do volume tumoral

A espessura e o volume dos tumores foram monitorados diariamente por ultrassonografia com o sistema Vevo 3100 (FUJIFILM VisualSonics, EUA), equipado com o transdutor MX 550D (40 MHz). Para calcular o volume tumoral, foram adquiridas imagens em modo 3D da região afetada, as quais foram posteriormente analisadas no software Vevo LAB (FUJIFILM VisualSonics, EUA).

### 2.7. Análise histológica

Os camundongos receberam a primeira sessão terapêutica no Dia 1 e, após 24 horas, foram submetidos à segunda sessão (Dia 2). Após 72 horas da última aplicação, os animais foram eutanasiados (Dia 5) para a coleta dos tumores. Foram realizadas biópsias excisionais, abrangendo toda a área tratada e uma margem de tecido saudável ao redor. As amostras foram fixadas em solução tamponada de formaldeído e enviadas ao Laboratório de Diagnóstico Médico Veterinário da Texas A&M para

coloração com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas coradas foram digitalizadas com o equipamento NanoZoomer S360 Digital (Hamamatsu Photonics K.K., EUA) e analisadas histologicamente por meio do software NDP.view2 (Hamamatsu TV Co., Ltd., EUA).

## 2.8. Análise de dados

Todos os gráficos e análises de dados foram realizados com o software Origin 9.50 (OriginPro 2018, OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em quatro ocasiões independentes. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. A razão de inibição tumoral ( $\eta_x$ ) alcançada em cada grupo (x: ultrassom e SDT) foi calculada conforme mostrado abaixo:

$$\eta_x = 1 - \bar{V}_f^x / \bar{V}_f^c \quad (2)$$

Onde  $\bar{V}_f^x$  é o volume tumoral médio normalizado no dia 5 correspondente ao grupo x e  $\bar{V}_f^c$  é o volume tumoral normalizado no dia 5 correspondente ao grupo controle.

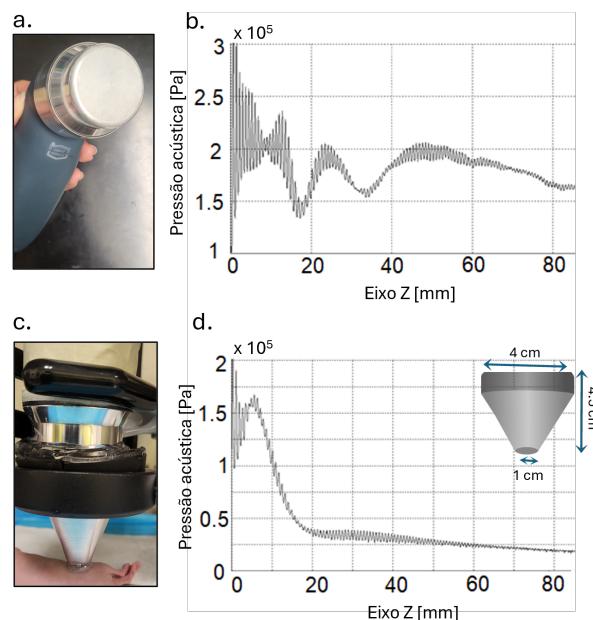
## 3. Resultados

### 3.1. Medidas acústicas

A Figura 1-a mostra o transdutor de área grande, o qual foi posicionado no ponto  $(x, y, z) = (0, 0, 0)$  dentro do tanque de varredura, e o hidrofone foi inicialmente posicionado próximo ao centro do cabeçote para iniciar a coleta de dados. A Figura 1-b mostra o perfil de pressão acústica mapeado ao longo da propagação do ultrassom no eixo z. O perfil indica que a pressão acústica oscila em torno de  $2.10^5$  Pa até  $z=50$  mm. A região próxima à fonte de ultrassom, estendendo-se desde  $z=0$  mm até  $z=50$  mm, constitui o campo próximo do campo acústico, enquanto a região além de  $z=50$  mm representa o campo distante. Este é o perfil de feixe padrão de um transdutor de ultrassom de onda plana.

Dado o objetivo deste estudo de otimizar e desenvolver protocolos de TSD para o tratamento de melanoma cutâneo foi crucial concentrar a energia do ultrassom na pele dos camundongos. Portanto, um guia de ondas cônicos de alumínio foi elaborado para este estudo e acoplado ao transdutor (Figura 1-c). A face maior do guia de ondas, medindo 4 cm de diâmetro, foi adaptada de acordo ao diâmetro do cabeçote do transdutor, enquanto a face menor, medindo 1 cm de diâmetro, foi ajustada para irradiar tumores em estágio inicial. A Figura 1-d mostra o perfil de pressão acústica mapeado ao longo da propagação do ultrassom no eixo z correspondente a esta nova configuração. O perfil padrão mostrado na Figura 1-b mudou para um perfil decrescente ao longo do eixo z mostrado na Figura 1-d. Este novo perfil indica que a pressão acústica oscila em torno de  $1.5.10^5$  Pa até  $z=10$  mm, a partir do qual cai para

zero. Consequentemente, a maior amplitude de pressão foi transmitida próximo à face menor do guia de ondas, correspondendo à localização da região alvo (aprox. 5 mm de profundidade) nos experimentos *in vivo*. Observou-se que o uso de alumínio resultou em uma redução de ~25% na pressão acústica em comparação com a pressão fornecida sem o guia de ondas. Isso provavelmente pode ser devido ao material e à geometria do guia de ondas.



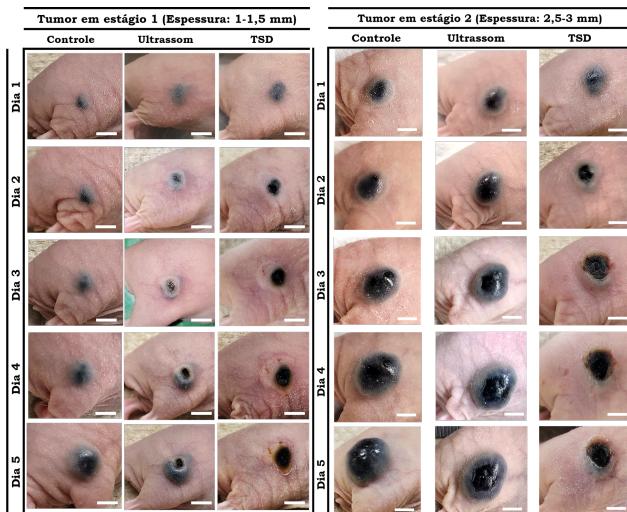
**Figura 1.** Perfil de pressão acústica mapeados ao longo do eixo z em  $x, y = 0$  correspondente ao (a,b) transdutor livre e ao (c,d) o transdutor acoplado a um guia de onda cônicos de alumínio.

### 3.2. Avaliação qualitativa dos efeitos da TSD

A Figura 2 mostra as fotografias coletadas diariamente do flanco direito de camundongos portadores de tumores em estágios 1 e 2, correspondentes a cada grupo experimental. Os camundongos nos grupos ultrassom apresentaram apenas efeitos leves na pele sobrejacente ao tumor. Em contraste, os camundongos dos grupos tratados com TSD apresentaram danos visíveis na área de sonicação, estendendo-se parcialmente para a região de irradiação circundante.

A Figura 3 apresenta as imagens de ultrassom dos tumores em estágio 1 e 2 coletadas entre os dias 1 e 5, correspondentes a cada grupo experimental. As imagens dos grupos controle apresentaram o crescimento progressivo do tumor ao longo dos dias, mantendo uma forma elíptica. A epiderme e a derme, o tumor intradérmico e a camada do *panniculus carnosus* abaixo dos tumores são distinguíveis. Nos grupos ultrassom, os tumores também mantiveram a forma elíptica; no entanto, foram observadas leves alterações na pele sobrejacente ao tumor. Além disso, foi observada uma mudança na densidade tumoral após a sonicação dos tumores. Isso se reflete na mudança de cor da imagem de ultrassom, passando de tons de cinza claro ou branco (áreas

mais densas) para tons mais escuros (áreas menos densas). Nos grupos TSD, observou-se deformação perceptível da pele sobrejacente ao tumor, inchaço da pele ao redor da área de sonicação, alterações estruturais no tumor, evidenciadas pela perda de sua forma elíptica inicial, e redução da densidade tumoral, indicada pelo escurecimento da região central do tumor.

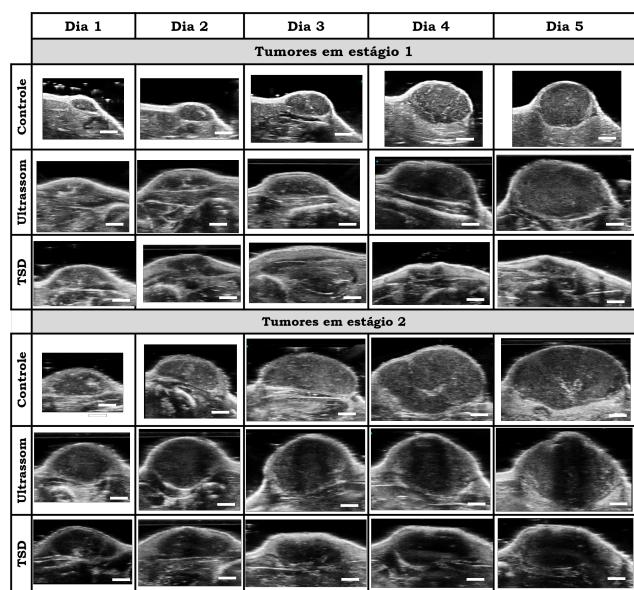


**Figura 2.** Fotografia representativa do flanco direito de camundongos com tumores em estágio 1 e 2 nos dias 1 a 5, correspondentes a cada grupo experimental (Controle, ultrassom e TSD). Barra branca= 0,5 cm.

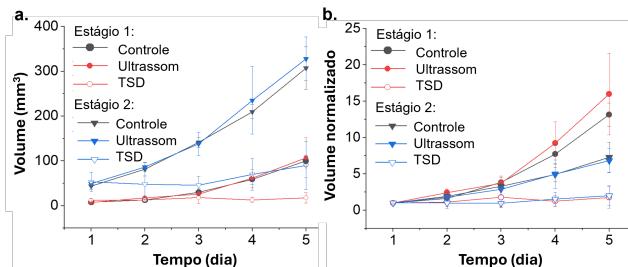
### 3.3. Avaliação quantitativa dos efeitos da TSD

Conforme mostrado na Figura 4-a, o volume tumoral médio no Dia 5 foi de  $100 \pm 12$ ,  $107 \pm 45$ ,  $18 \pm 12$   $\text{mm}^3$  para os grupos controle, ultrassom e TSD, respectivamente, correspondentes aos tumores em estágio 1. O volume tumoral médio no Dia 5 foi de  $307 \pm 47$ ,  $328 \pm 49$  e  $90 \pm 54$   $\text{mm}^3$  para os grupos controle, ultrassom e TSD, respectivamente, correspondentes aos tumores em estágio 2. A Figura 4-b apresenta o volume tumoral médio normalizado ao longo do tempo, calculado pela divisão do volume tumoral medido a cada dia pelo volume tumoral inicial ( $\sim 8 \pm 2 \text{ mm}^3$  para tumores em estágio 1 e  $\sim 50 \pm 15 \text{ mm}^3$  para tumores em estágio 2). Para ambos os estádios tumorais, o crescimento do volume tumoral no grupo TSD foi significativamente reduzido em comparação a seus correspondentes grupos controle e ultrassom, indicando que a TSD inibiu a progressão tumoral.

A razão de inibição tumoral, calculada pela equação (2), do protocolo TSD aplicado em tumores de estágio 1 e estágio 2 foi de  $0,87 \pm 0,11$  e  $0,73 \pm 0,19$ , respectivamente. Assim, em comparação com seus grupos controle, a inibição tumoral da TSD para tumores de estágio 1 e estágio 2 foi de 87% ( $p \leq 0,01$ ) e 73% ( $p \leq 0,05$ ), respectivamente. A inibição tumoral do SDT foi ligeiramente maior em tumores de estágio 1 do que em tumores de estágio 2; no entanto, a diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa.



**Figura 3.** Ultrassonografia de tumores em estágio 1 e 2 nos dias 1 a 5, correspondentes a cada grupo experimental (Controle, ultrassom e TSD). Barra branca = 1,5 mm.

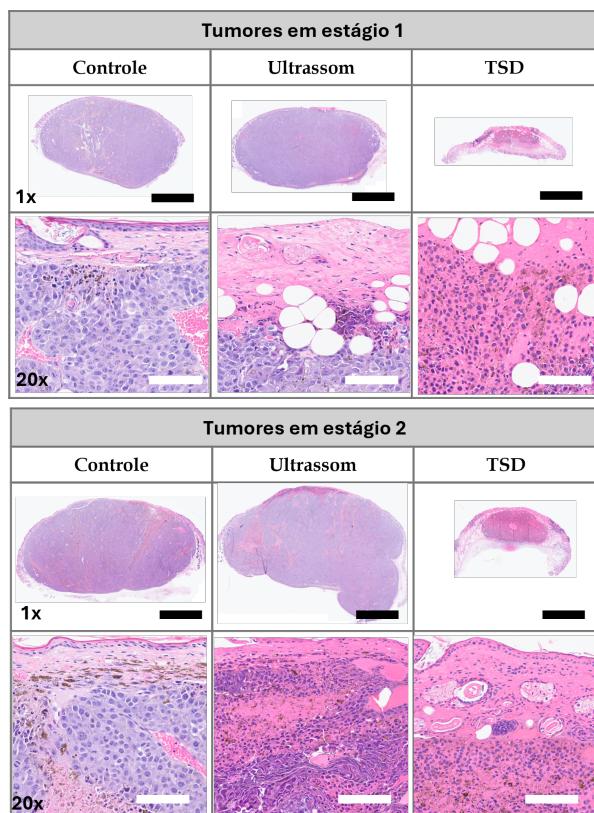


**Figura 4.** Curvas de crescimento tumoral representando (a) o volume tumoral médio e (b) o volume tumoral normalizado médio ao longo do tempo para os grupos experimentais correspondentes aos tumores em estágio 1 e 2.

### 3.4. Avaliação histológica dos efeitos da TSD

A Figura 5 mostra as imagens histológicas coradas com H&E dos tumores coletados no Dia 5 para cada grupo experimental. As lâminas apresentadas com ampliação de 1x representam a área transversal completa dos tumores ao longo do eixo de irradiação, ilustrando assim a profundidade do dano induzido em cada grupo experimental. As lâminas com ampliação 20x apresentam uma melhor visualização do dano. Observamos que nos grupos controle dos tumores em estágio 1 e estágio 2, o tecido epitelial foi preservado e o limite entre o epitélio e a região do tumor foi distinguível em comparação aos grupos tratados. Se identificaram ilhas de autonecrose, que foram mais pronunciadas nos tumores em estágio 2, regiões contendo melanina e vasos sanguíneos. Nos grupos ultrassom de ambos os estágios, observou-se que o tecido epitelial estava preservado, mas desorganizado e levemente necrosado nas áreas mais superficiais do tumor. O tecido apresentou-se friável e infiltrados inflamatórios foram detectados adjacentes às regiões necróticas. Esses danos foram atribuídos aos efeitos sonomecânicos. Os tumores também exibiram ilhas de autonecrose dispersas por toda a área transversal, semelhantes às observadas no grupo controle. Nos grupos TSD de ambos os estágios, observou-se tecido epitelial desorganizado

com pontos de ulceração assim como áreas necróticas que abrangeram quase toda a região transversal. Infiltrados inflamatórios adjacentes às zonas necróticas e extravasamento de vasos sanguíneos também foram observados.



**Figura 5.** Lâminas coradas com H&E dos tumores dos grupos controle, ultrassom, e TSD, correspondente aos tumores em estágio 1 e 2. Barra preta = 2,5 mm (ampliação de 1x). Barra branca = 100 µm (ampliação de 20x).

A temperatura da pele, localizada sobre o tumor e em contato com a face menor do guia de ondas, aumentou até 3 °C nos minutos finais da irradiação por ultrassom. Com base nisso, concluiu-se que os danos observados nos grupos ultrassom e TSD se devem, em mínima parte, a efeitos térmicos.

#### 4. Discussão

Estudos *in vivo* anteriores demonstraram o potencial da TSD mediada por ALA no tratamento do melanoma pigmentado, porém a diferença do presente estudo, a implantação das células do melanoma foi via injeção subcutânea.(18-22) Este modelo tumoral subcutâneo é compatível com um subtipo clínico de melanoma cutâneo humano, conhecido como melanoma dérmico primário, o qual é um caso de melanoma pouco frequente.(33) Por isso, no presente trabalho as células do melanoma foram inoculadas intradérmicamente, por ser compatível com o caso mais frequente de melanoma cutâneo humano relatado em ambientes clínicos. Além disso, a região intradérmica é um ambiente altamente vascularizado com uma densa população de células dendríticas, o que melhora o fornecimento de oxigênio e aumenta a imunogenicidade do tumor. Com base nesses achados, foi levantada a hipótese

de que a aplicação da TSD em tumores intradérmicos amplificaria os efeitos antitumorais da TSD.

Na literatura, é comum padronizar o início do tratamento com base no volume tumoral específico, em vez da espessura do tumor. No entanto, a espessura tumoral é um fator clínico crítico usado no sistema de estadiamento do melanoma. Portanto, neste estudo, o tratamento foi iniciado com base na espessura do tumor. Essa abordagem se alinha mais às práticas clínicas e aumenta a relevância translacional dos resultados.

Estudos anteriores que investigaram os efeitos da TSD no tratamento do melanoma comumente utilizaram tumores com volumes iguais ou maiores a 100 mm<sup>3</sup>. Em contraste, os tumores utilizados neste trabalho foram menores, representando melanoma cutâneo humano em estágio inicial com espessuras entre 1-3 mm.

Dado que a espessura tumoral pode influenciar os resultados terapêuticos de diversos tratamentos dinâmicos, é importante avaliar o impacto da espessura do tumor na eficiência da TSD para otimizar os protocolos, portanto foram avaliados tumores em estágios iniciais diferentes.

Os parâmetros de ultrassom comumente relatados na literatura incluem frequências que variam de 0,5 a 3 MHz e baixas intensidades de ultrassom que variam de 0,5 a 3 W/cm<sup>2</sup>. Os parâmetros de ultrassom que apresentaram melhores resultados terapêuticos neste trabalho foram 2 W/cm<sup>2</sup> de intensidade de ultrassom pulsado, com frequência do pulso de 100 Hz e ciclo de trabalho de 50%, e um período de irradiação de 30 minutos. Esses parâmetros resultam em uma dose total administrada de 1800 J/cm<sup>2</sup>, maior do que em estudos *in vivo* anteriores. No entanto, o dano gerado apenas pela irradiação dessa dose de ultrassom foi muito menor do que aquele gerado pela TSD. Isto indica que essa quantidade de energia de ultrassom estaria sendo dissipada de alguma forma, sendo a energia transmitida à pele insuficiente para gerar danos térmico e mecânico drásticos. Conforme mostrado na Figura 1-b e 1-d, podemos comprovar que tal dissipação de energia ocorre durante a propagação das ondas de ultrassom ao longo da guia de ondas. Essa redução de energia ocorre devido à geometria e material do guia de ondas. Apesar disso, o guia de ondas foi feito de alumínio em vez de outros materiais dado os estudos prévios existentes e a sua facilidade de uso. (19,21)

Os resultados deste estudo demonstraram que o protocolo de TSD sob estudo supriu eficazmente o crescimento do volume tumoral e induziu necrose em profundidades maiores em comparação com os grupos ultrassom e controle. Este resultado foi observado para ambos os estágios tumorais, indicando que, nas condições utilizadas neste estudo, a indução de efeitos sonodinâmicos é alcançável mesmo em tumores em estágio 2. Em tumores de estágios iniciais, como os estudados, a incorporação de uma guia de ondas mostrou-se fundamental, permitindo uma aplicação mais focalizada da energia ultrassônica em uma região de menor área,

minimizando danos aos tecidos saudáveis adjacentes.

## 5. Conclusões

A indução de efeitos sonodinâmicos não foi limitada pela espessura do tumor inibindo o crescimento de tumores de até 3 mm de espessura, e gerando necrose em quase toda a região tumoral. As medições acústicas por varredura de hidrofone foram fundamentais para compreender o impacto da guia de ondas no perfil de pressão acústica. A incorporação de um guia de ondas para aplicação da TSD no tratamento de tumores mais finos provou ser uma abordagem eficaz. A ultrassonografia de alta resolução foi essencial na avaliação do volume tumoral após o tratamento, uma vez que o inchaço da região tratada dificulta as medições usando ferramentas convencionais, como o paquímetro.

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) da Texas A&M University (IACUC 2023-0137). Além disso, todos os procedimentos de experimentação animal descritos neste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes do IAEC para o cuidado e o uso de animais de laboratório e com as diretrizes ARRIVE.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio das Agências de Fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brasil - Código de Financiamento 001, Programa Institucional de Internacionalização da CAPES-PRINT: 88887.916115/2023-00; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos auxílios: 465360/2014-9, 306919/2019-2, 440237/2021-1, 305072/2022-6; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos auxílios: 2013/07276-1 (Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica - CePOF), 2014/50857-8 (Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia - INCT), 2022/10860-6, 2022/13224-3, 2023/04209-3 e 2024/07968-5, 2023/14868-4. Cancer Prevention and Research Institute of Texas (CPRIT, RR220054), Governor's University Research Initiative (GURI) e Chancellor's Research Initiative (CRI).

## Referências

- Society for immunotherapy of cancer. Staging Melanoma, [cited/cesso 2024 Dec 22]. Available from: <https://www.sitcancer.org/clinician/resources/melanoma/staging>.
- Aim at melanoma foundation. Melanoma, [cited/cesso 2022 Oct 30]. Available from: <https://www.aimatmelanoma.org/melanoma-101/>.
- National Cancer Institute. Melanoma treatment (PDQ®)-patient version, [cited/cesso 2022 Oct 30]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq>.
- Finnerty, Celeste C., et al. The surgically induced stress response. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2013; 37: 21S-29S.
- Pratavieira, Sebastiao, et al. The physics of light and sound in the fight against skin cancer. *Brazilian Journal of Physics*. 2022; 52(4): 106.
- Rosenthal, Ionel, Joe Z. Sostaric e Peter Riesz. Sonodynamic therapy—a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*. 2004; 11(6):349-363.
- Yumita, Nagahiko, et al. Sonochemical activation of hematoporphyrin: an ESR study. *Radiation research*. 1994; 171-176.
- Li, Dong, et al. Organic sonosensitizers for sonodynamic therapy: from small molecules and nanoparticles toward clinical development. *Small*. 2021; 17(42): 2101976.
- Rengeng, Liu, et al. Sonodynamic therapy, a treatment developing from photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2017; 19: 159-166.
- Choi, Victor, Maneesha A. Rajora, and Gang Zheng. Activating drugs with sound: mechanisms behind sonodynamic therapy and the role of nanomedicine. *Bioconjugate Chemistry*. 2020; 31(4): 967-989.
- Tzerkovsky, D. A., E. L. Protopovich, and D. S. Stupak. Sonodynamic and sono-photodynamic therapy in oncology. *Biomedical Photonics*. 2019; 8(2): 31-46.
- Foglietta, Federica, et al. 5-Aminolevulinic acid triggered by ultrasound halts tumor proliferation in a syngeneic model of breast cancer. *Pharmaceuticals*. 2021; 14(10): 972.
- Lei, Huali, et al. Immunosondynamic therapy designed with activatable sonosensitizer and immune stimulant imiquimod. *ACS nano*. 2022; 16(7): 10979-10993.
- Wu, Sijia, et al. Bi-Pt Heterojunction Cascade Reaction Platform for Sono-Immunotherapy of Tumors via PANoptosis and Ferroptosis. *Advanced Healthcare Materials*. 2024; 13(30): 2401697.
- Li, Jingchao, et al. Precision cancer sono-immunotherapy using deep-tissue activatable semiconducting polymer immunomodulatory nanoparticles. *Nature communications*. 2022; 13(1): 4032.
- Zha, Boya, et al. "A phase I clinical trial of sonodynamic therapy combined with temozolamide in the treatment of recurrent glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*. 2023; 162(2): 317-326.
- Huangfu, Linkuan, et al. A phase I clinical trial of sonodynamic therapy combined with radiotherapy for brainstem gliomas. *International Journal of Cancer*. 2025; 156(5): 1005-1014.
- Wang, Shan, et al. 5-Aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy reverses macrophage and dendritic cell passivity in murine melanoma xenografts. *Ultrasound in medicine & biology*. 2014; 40(9): 2125-2133.
- Hu, Zheng, et al. 5-Aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy induces anti-tumor effects in malignant melanoma via p53-miR-34a-Sirt1 axis. *Journal of dermatological science*. 2015; 79(2): 155-162.
- McEwan, Conor, et al. Comparing the efficacy of photodynamic and sonodynamic therapy in non-melanoma and melanoma skin cancer. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2016; 24(13): 3023-3028.
- Peng, Yan, et al. Sonodynamic therapy improves anti-tumor immune effect by increasing the infiltration of CD8+ T cells and altering tumor blood vessels in murine B16F10 melanoma xenograft. *Oncology reports*. 2018; 40(4): 2163-2170.
- Fan, Haixia, et al. 5-aminolevulinic-acid-mediated sonodynamic therapy improves the prognosis of melanoma by inhibiting survivin expression. *Cancer Biomarkers*. 2020; 28(3): 301-308.
- Borah, Ballav M., et al. Sonodynamic therapy in combination with photodynamic therapy shows enhanced long-term cure of brain tumor. *Scientific reports*. 2020; 10(1): 21791.
- Zhan, Meixiao, et al. Dual-Cascade Activatable Nanopotentiators Reshaping Adenosine Metabolism for Sono-Chemodynamic-Immunotherapy of Deep Tumors. *Advanced Science*. 2023; 10(10): 2207200.
- Lan, Minhuan, et al. Photosensitizers for photodynamic therapy. *Advanced healthcare materials*. 2019; 8(13): 1900132.
- Xu, Haobo, et al. The decomposition of protoporphyrin IX by ultrasound is dependent on the generation of hydroxyl radicals. *Ultrasonics sonochemistry*. 2015; 27: 623-630.
- Lv, Yanhong, et al. Antiproliferative and apoptosis-inducing effect of exo-protoporphyrin IX based sonodynamic therapy on human oral squamous cell carcinoma. *Scientific reports*. 2017; 7(1): 40967.

28. Ayala, Erika Toneth Ponce, et al. Photodynamic and sonodynamic therapy with protoporphyrin IX: in vitro and in vivo studies. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2021; 47(4): 1032-1044.
29. Bagdonas, Saulius, et al. Phototransformations of 5-Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin IX in vitro: A Spectroscopic Study. *Photochemistry and photobiology*. 2000; 72(2): 186-192.
30. Lucky, Sasidharan Swarnalatha, Khee Chee Soo, and Yong Zhang. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical reviews*. 2015; 115(4): 1990-2042.
31. Carlson, Peter M., et al. Depth of tumor implantation affects response to *in situ* vaccination in a syngeneic murine melanoma model. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2021; 9(4): e002107.
32. Ayala, Erika Toneth Ponce, et al. Quantification of protoporphyrin IX in murine pigmented melanoma induced by systemic and topical ALA administration protocols. *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXXII*. Vol. 12823. SPIE, 2024.
33. Swetter, Susan M., et al. Primary dermal melanoma: a distinct subtype of melanoma. *Archives of dermatology*, 2004; 140(1): 99-103.

**Contato:**

*Sebastião Pratavieira*

*Instituto de Física de São Carlos*

*Av. Trab. São Carlense, 400 - Parque Arnold*

*Schimidt, São Carlos - SP, 13566-590*

*prata@ifsc.usp.br*