



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Anàlisi translacional de la teràpia fotodinàmica mitjançant l'àcid 5-aminolevulínic en el tractament del Glioblastoma

Abel Ferrés Pijoan

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Clínic
Barcelona



Institut
D'Investigacions
Biomèdiques
August Pi i Sunyer

Anàlisi translacional de la teràpia fotodinàmica mitjançant l'àcid 5-aminolevulínic en el tractament del Glioblastoma

Memòria de tesi doctoral presentada per l'Abel Ferrés Pijoan per optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona

Dirigida per Joaquim Enseñat Nora MD, PhD i per José Juan González Sánchez MD, PhD

Tutoritzada per José Juan González Sánchez MD, PhD

Programa de Doctorat de Medicina i Recerca Translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona

Juny de 2024

AGRAÏMENTS

Vull agrair a les institucions de la Universitat de Barcelona i l'hospital Clínic de Barcelona la possibilitat de realitzar la tesi doctoral sota la seva empara.

Vull agrair als meus directors i tutor de tesi, els doctors Joaquim Enseñat Nora i José Juan González Sánchez, la dedicació, orientació i ajuda incondicional per tirar endavant aquest projecte de tesi doctoral.

Vull agrair a tots els col·laboradors que han format part dels estudis d'investigació que s'inclouen dins aquesta tesi doctoral, ja que han tingut un paper clau en el seu òptim desenvolupament.

FINANÇAMENT

L'article publicat a la revista Cells i titulat "Preclinical Studies with Glioblastoma Brain Organoid Co-Cultures Show Efficient 5-ALA Photodynamic Therapy" ha rebut finançament dels Laboratoris Gebro Pharma S.A., del Ministeri de Sanitat d'Espanya, l'institut Carles III i del Fons Europeu de Desenvolupament Regional.

ÍNDEX

ABREVIATURES I ACRÒNIMS	9
ENUMERACIÓ DELS ARTICLES DE LA TESI	11
RESUM DE LA TESI.....	12
INTRODUCCIÓ	15
1. Breu introducció al Glioblastoma	15
1.1. Epidemiologia.....	15
1.2. Histopatologia i classificació	16
1.3. Maneig.....	16
1.4. Futur	23
2. Teràpia fotodinàmica	23
2.1. Orígens	23
2.2. Mecanismes de mort cel·lular induïts per la TFD.....	24
2.3. Efectes immunomoduladors de la TFD	24
2.4. Àcid 5-Aminolevulínic com a fotosensibilitzador	25
2.5. Situació actual de la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA.....	27
3. Justificació de la tesi doctoral	39
HIPÒTESIS.....	42
OBJECTIUS	43
MATERIALS, MÈTODES I RESULTATS.....	44
1. “Photodynamic Therapy in glioblastoma: Detection of intraoperative inadvertent 5-ALA mediated photodynamic therapeutical effect after gross total resection” (Teràpia	

fotodinàmica en el glioblastoma: Detecció de l'efecte fotodinàmic terapèutic inadvertit amb 5-ALA després de la resecció completa)	44
2. “Preclinical Studies with Glioblastoma Brain Organoid Co-Cultures Show Efficient 5-ALA Photodynamic Therapy” (Estudis preclínics amb co-cultius d'organoides cerebrals de glioblastoma demostren l'eficàcia de la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA).....	55
DISCUSSIÓ.....	75
CONCLUSIONS.....	86
BIBLIOGRAFIA	87

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

GB: Glioblastoma

SNC: Sistema Nerviós Central

GIC: “Glioma Initiating Cells”

WHO: “World and Health Organization”

IDH: Isocitrat Deshidrogenasa

5-ALA: Àcid 5-Aminolevulínic

MGMT: Metilguanina-ADN Metil-Transferasa

ADN: Àcid Desoxiribonucleic

VEGF: “Vascular Endothelial Growht Factor”

TTF: “Tumor Treating Fields”

LITT: “Laser Interstitial Thermal Therapy”

MHT: “Magnetic Hyperthermal Therapy”

TFD: Teràpia Fotodinàmica

PBGD: Porfobilinogen Desaminasa

ABC: “ATP-Binding Cassette”

FECH: Ferroquelatasa

SLP: Supervivència Lliure de Progressió

ROS: “Radical Oxigen Singlet”

ON: Òxid Nítric

ONS: Òxid Nítric Sintasa

TFDi: Teràpia Fotodinàmica intersticial

IF: Immunofluorescència

GFP: “Green Fluorescence Protein”

LDH: Lactat Deshidrogenasa

ENUMERACIÓ DELS ARTICLES DE LA TESI

Tesi en format compendi de publicacions.

La tesi consta de dos objectius i dos articles que s'enumeren a continuació:

1. **Ferrés A**, Di Somma A, Mosteiro A, Topczewski TE, Roldán P, Pedrosa L, Diao D, Pineda E, Sierra À, Enseñat J, González-Sánchez JJ. Photodynamic therapy in glioblastoma: Detection of intraoperative inadvertent 5-ALA mediated photodynamic therapeutical effect after gross total resection. *Front Oncol.* 2022 Dec 2;12:1080685. Factor d'Impacte de 4,7 i 2n Quartil segons "Scimago Journal Rank".
2. Pedrosa L, Bedia C, Diao D, Mosteiro A, **Ferrés A**, Stanzani E, Martínez-Soler F, Tortosa A, Pineda E, Aldecoa I, Centellas M, Muñoz-Tudurí M, Sevilla A, Sierra À, González Sánchez JJ. Preclinical Studies with Glioblastoma Brain Organoid Co-Cultures Show Efficient 5-ALA Photodynamic Therapy. *Cells.* 2023 Apr 10;12(8):1125. Factor d'Impacte de 6 i 1r Quartil segons "Scimago Journal Rank".

RESUM DE LA TESI

Títol: Anàlisi translacional de la teràpia fotodinàmica mitjançant l'àcid 5-aminolevulínic en el tractament del Glioblastoma.

Introducció: El Glioblastoma (GB) IDH-wild type (“World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System 2021”) continua essent el tumor cerebral primari més freqüent i letal en adults tot i aplicar el millor esquema terapèutic (STUPP). La naturalesa altament infiltrant del GB, juntament amb la gran tendència a la recurrència (a partir de les “Glioma Initiating Cells”; GIC) limita la capacitat del control local i regional de la malaltia amb els esquemes terapèutics actuals. És per això que la identificació de nous tractaments, com la teràpia fotodinàmica (TFD) amb l'àcid 5-Aminolevulínic (5-ALA), és de gran interès científic. La TFD utilitza un agent fotosensibilitzant primari o secundari que s'acumula específicament a l'interior del teixit diana. Mitjançant l'aplicació directa de llum a una longitud d'ona específica, aquest s'activa i es produeix l'efecte fototòxic de forma selectiva. En el cas específic del GB, es proposa el 5-ALA com a agent fotosensibilitzant secundari, el qual és convertit a protoporfirina IX (PpIX) a l'interior de la cèl·lula tumoral, on s'acumula. Una vegada s'aplica la dosi lumínica corresponent a una longitud d'ona de 620 nm, la PpIX s'activa i s'inicia l'efecte fototòxic a partir la gènesi de radicals lliures d'oxigen. Amb la finalitat d'aprofundir en el coneixement i l'aplicabilitat de la TFD mitjançant 5-ALA en el tractament del GB, aquesta tesi doctoral es basarà en dues línies d'investigació amb caràcter translacional: Per una banda, es proposa avaluar la possibilitat d'haver estat aplicant la TFD de forma inadvertida en aquells pacients als qui s'ha utilitzat la resecció guiada per fluorescència amb 5-ALA. Per altra banda, es proposa un estudi experimental de laboratori que ens permetria valorar l'efecte de la TFD mitjançant 5-ALA sobre les GIC co-cultivades en forma de tumorsferes amb els nous models d'organoids cerebrals (“mini-brains”) desenvolupats pel nostre grup de treball.

Hipòtesis: Primera hipòtesi: Podria existir una menor probabilitat de recurrència tumoral en el volum de parènquima comprès dins el primer centímetre de la vora de la cavitat quirúrgica en els pacients afectats de GB, als qui s'ha pogut obtenir una resecció completa guiada per fluorescència mitjançant 5-ALA. Segona hipòtesi: Els models de co-cultiu dels

organoids cerebrals amb GIC en forma de tumorsferes ens permetria avaluar l'eficàcia, la seguretat, selectivitat i dosi lumínica òptima preliminars de la TFD amb 5-ALA.

Objectius: El primer objectiu consisteix a avaluar en una sèrie retrospectiva de pacients afectats de GB si l'ús de la resecció guiada per fluorescència mitjançant el 5-ALA ha induït, de forma inadvertida, un efecte fotodinàmic terapèutic determinat a través d'una menor probabilitat de recurrència tumoral dins el volum comprès fins el primer centímetre des de la cavitat quirúrgica en aquells pacients als qui s'ha aconseguit una resecció completa. El segon objectiu consisteix a simular les implicacions esperables de la TFD enfront de les GIC en termes d'eficàcia, seguretat, selectivitat i dosi lumínica òptima a través de l'ús de models de laboratori consistents en el co-cultiu d'organoids cerebrals amb tumorsferes de GIC.

Mètodes: Pel compliment del primer objectiu es proposa un estudi de cohorts retrospectiu on s'inclouran 33 individus als qui s'ha aconseguit una resecció completa de l'àrea tumoral captant de contrast, sense arribar a la resecció supramàxima. Es crearan dos grups de comparació d'acord amb la localització de la recurrència tumoral (A: dins l'àrea volumètrica corresponent al primer centímetre des de la cavitat quirúrgica i B: a partir del primer centímetre des de la cavitat quirúrgica). Múltiples variables, entre elles l'ús de la resecció guiada per fluorescència amb 5-ALA es compararan entre els dos grups a través d'una anàlisi univariant i multivariant. Pel compliment del segon objectiu plantejat, es proposa un estudi experimental de laboratori on s'avaluarà, a través d'un model complex obtingut a partir del co-cultiu de GIC agrupades en tumorsferes juntament amb organoids cerebrals, les dades d'eficàcia i selectivitat de la TFD amb 5-ALA sobre les cèl·lules mare tumorals. Per cada intensitat i temps d'exposició lumínica es compararan dues plaques de 96 mostres (experimental amb 5-ALA vs. control sense 5-ALA) de tumorsferes-organoid cerebral on hi haurà una representació equitativa d'ambdues estirps cel·lulars tumorals (proneural i mesenquimal). La disminució o absència de generació lumínica respecte l'assaig cinètic inicial en el grup experimental enfront del control, juntament amb l'augment dels nivells de LDH ens permetrà avaluar de forma quantitativa la citotoxicitat. L'obtenció de fotografies d'alta resolució a les 72 h ens permetrà avaluar la selectivitat de forma qualitativa juntament amb la viabilitat de l'organoid cerebral.

Resultats principals: En relació amb el primer objectiu: En l'anàlisi univariant els dos grups de comparació únicament diferien amb relació a l'administració de 5-ALA, la qual estava significativament relacionada amb un menor risc relatiu de presentar la recurrència dins el primer centímetre de la cavitat quirúrgica (Risc Relatiu (RR)=0,655 (95% CI 0,442-0,970), valor de $p=0,046$). Aquest resultat es va corroborar en l'anàlisi multivariant (RR=0,730 (95% CI 0,340-0,980, valor de $p=0,017$). Amb relació al segon objectiu es va observar una clara disminució en la fluorescència GFP entre les cèl·lules GIC7 (proneurals) soles ($p = 0,005$) i en aquelles co-cultivades amb els organoids cerebrals ($p = 0,01$). A més, es va evidenciar una tendència a la disminució de la fluorescència en les cèl·lules PG88 (mesenquimals) soles i en co-cultiu, tot i que no va ser estadísticament significativa. En l'anàlisi d'immunofluorescència (IF), el nombre de cèl·lules apoptòtiques va augmentar després de la TFD en les àrees envaïdes per GIC, tant en GIC7 com en PG88.

Conclusions: S'ha detectat l'efecte fotodinàmic terapèutic amb 5-ALA que ha tingut lloc de forma inadvertida en els pacients afectats de GB amb resecció completa. S'ha creat un model complex "in vitro" a partir del co-cultiu de tumorsferes i organoids cerebrals que ens permetrà avaluar amb major fidelitat els tractaments enfront del GB, entre elles la TFD amb 5-ALA. S'han demostrat l'eficàcia, seguretat, selectivitat i la dosi lumínica òptima de la TFD amb 5-ALA enfront de les GIC d'estirp proneural i mesenquimal.

INTRODUCCIÓ

1. Breu introducció al Glioblastoma

El Glioblastoma (GB) és el tumor cerebral primari maligne més freqüent en adults, representant aproximadament el 57% de tots els gliomes i el 48% de totes les neoplàsies primàries malignes del sistema nerviós central (SNC) (1, 2).

Malgrat els avenços recents el maneig multimodal del glioblastoma, que inclou la cirurgia, radioteràpia, teràpia sistèmica (quimioteràpia i teràpies dirigides) i les cures de suport, el pronòstic general segueix essent molt desfavorable i la supervivència a llarg termini pràcticament nul·la (1, 2).

A més, la morbiditat associada amb el deteriorament progressiu de la funció neurològica i la qualitat de vida acaba tenint un impacte devastador tant en els pacients, els cuidadors com a les famílies (1, 2).

1.1. Epidemiologia

Actualment, la incidència mitjana del glioblastoma ajustada per edat és de 3,21 casos per cada 100000 persones-any, variant segons l'edat i el gènere. L'edat mitjana en el moment del diagnòstic és de 65 anys, amb taxes més altes al grup dels 75 als 84 anys (1, 2).

Addicionalment, el GB és 1,58 vegades més comú en homes que en dones, amb una incidència anual ajustada per edat de 4 en homes i 2,53 en dones per cada 100000 persones-any. Amb relació a l'ètnia, el GB és més freqüent en caucàsics (1, 2).

Es coneixen pocs factors de risc validats pel glioblastoma: L'exposició a la radiació ionitzant és el factor de risc més fortament associat amb el GB i l'únic potencialment modificable. També s'ha identificat una associació inversa entre el GB i els antecedents d'atòpia, al·lèrgies i altres condicions relacionades amb el sistema immunitari, tot i que la base biològica no s'ha aclarit completament (3-5).

Existeixen algunes síndromes genètics rars associats al glioblastoma com és el cas del la síndrome de Li-Fraumeni i la síndrome de Lynch, representant menys de l'1% dels casos (3-5).

El GB continua tenint un pronòstic molt desfavorable: L'edat avançada, un mal estat funcional prequirúrgic, la localització supratentorial i la resecció incompleta són els principals factors de mal pronòstic establerts (6).

En l'actualitat, la mediana de supervivència dels pacients afectats de GB és de 15 mesos, destacant que en menys del 9,8% dels casos s'assoleix una supervivència igual o superior als 5 anys, tot i haver aplicat el millor tractament disponible en l'actualitat (6).

1.2. Histopatologia i classificació

Histopatològicament, el GB s'origina a partir de les cèl·lules progenitores neuroglials, també anomenades GIC ("Glioma Initiating Cells"). En l'actualitat, la "World Health Organization (WHO) Classification of Tumors of the Central Nervous System 2021", destaca el paper de la biologia molecular en la catalogació de les diferents neoplàsies primàries del sistema nerviós central, i el glioblastoma no n'és una excepció (7).

Segons aquesta classificació, l'absència en la mutació de la Isocitrat Deshidrogenasa (IDH); "IDH-wild type"), és clau per atorgar la denominació de Glioblastoma en aquelles neoplàsies que presenten característiques histopatològiques compatibles amb les del grup dels gliomes difusos de l'adult, conferint-ne automàticament el grau més alt d'agressivitat. En l'actualitat, doncs, la denominació més acurada del glioblastoma és: Glioblastoma IDH-wild type (wt) (7).

1.3. Maneig

El maneig inicial estandarditzat per a la majoria dels tumors primaris del sistema nerviós central és la resecció quirúrgica, la qual es procura que sigui màxima i segura. Aquesta permet un diagnòstic histopatològic precís, la genotipització del tumor i la reducció del volum tumoral (8).

Concretament pel glioblastoma, basant-nos en el protocol STUPP, la resecció quirúrgica es segueix del protocol de quimioteràpia i radioteràpia que es presenta a continuació: Sis cicles de radioteràpia (60 Gy) durant 6 setmanes, amb Temozolomida diària concomitant i 6 cicles addicionals de manteniment amb Temozolomida (8).

En el cas de la recurrència no es disposa de cap estàndard de tractament establert i actualment existeix poca evidència que qualsevol intervenció prolongui la supervivència.

Davant la recurrència, les opcions terapèutiques inclouen: Reintervenció quirúrgica, reirradiació i teràpies sistèmiques com la Lamustina o el Bevacizumab (9, 10).

1.3.1. Cirurgia

La resecció màxima i segura, sempre que sigui factible, és el procés terapèutic principal en el tractament del GB (11-15).

Tot i no disposar d'assajos clínics aleatoritzats que ens permetin determinar el grau d'extensió de la resecció quirúrgica necessària per a prolongar al màxim la supervivència, generalment es recomana la resecció total si aquesta és tècnicament viable (11-15).

Diferents estudis retrospectius indiquen que la resecció total pot millorar la supervivència, fins i tot en pacients d'edat avançada i independentment de les característiques moleculars del tumor. A més, i justificat per les dades obtingudes en assajos clínics aleatoritzats, l'ús d'adjuvants terapèutics com és el cas de la resecció guiada per fluorescència mitjançant el 5-ALA (Àcid 5-Aminolevulínic), ha demostrat una millora en la supervivència lliure de progressió de la malaltia (11-15).

Existeixen situacions en les quals la cirurgia no és possible, com ara en cas de contraindicació mèdica o desestimació per part del pacient. Davant d'aquestes situacions, l'obtenció d'almenys una mostra tumoral per l'anàlisi anatomopatològica (histològic i molecular), sigui mitjançant la biòpsia estereotàctica o la biòpsia oberta, és fonamental per guiar el tractament adjuvant (16).

Actualment, a més, disposem de nombrosos instruments d'ajuda tant preoperatoris com intraoperatoris per tal d'aconseguir reseccions el màxim d'àmplis possible, minimitzant la morbiditat quirúrgica (17-19).

Els estudis d'imatge preoperatoris, com és la ressonància magnètica funcional i la tractografia mitjançant les seqüències de difusió, són especialment útils en aquells tumors que estan situats propers o que envaeixen àrees cerebrals eloqüents (17-19).

La craniotomia desperta amb cartografia de la motricitat i de la parla mitjançant la col·locació d'elèctrodes corticals també ens ajuda a aconseguir reseccions més segures en tumors propers o que envaeixen àrees cerebrals eloqüents (20).

Cal destacar l'auge en l'ús de la fluorescència intraoperatòria com a guia en la resecció quirúrgica mitjançant 5-ALA. En l'assaig clínic aleatoritzat esmentat anteriorment, la taxa de supervivència lliure de malaltia al cap de 6 mesos en els pacients als qui es va dur a terme la resecció guiada per fluorescència va ser d'un 40,6% en comparació amb el grup control, on la taxa lliure de supervivència de malaltia als 6 mesos va arribar únicament al 28,3%. Tot i la utilitat contrastada, l'ús d'aquest adjuvant terapèutic requereix equipament especialitzat que no sempre està a l'abast de tots els centres (15, 21).

Finalment, similar a la resecció guiada per fluorescència, l'ús d'imatge intraoperatòria com l'ecografia, la neuronavegació o la ressonància magnètica, ens permeten optimitzar l'extensió de la resecció així com millorar la seguretat del procediment quirúrgic (22).

1.3.2. Radioteràpia

La radioteràpia s'ha utilitzat durant molt de temps en el tractament del glioblastoma per tal de millorar el control local i regional de la malaltia i així aconseguir la màxima supervivència. Actualment, segueix essent una modalitat molt important i té el seu paper principal com a tractament adjuvant després de la cirurgia. El protocol actual consisteix en l'administració de 60 Grays (Gy) en fraccions de 2 Gy durant 6 setmanes, en combinació amb la quimioteràpia; Temozolomida (8).

El risc de necrosi per radiació associada al tractament depèn del volum cerebral irradiat, de la dosi administrada i de la susceptibilitat de l'estructura cerebral irradiada. En cas d'afecció d'estructures cerebrals altament eloqüents com podria ser el tronc cerebral o, en casos de volum tumoral elevat, es recomana utilitzar una dosi lleugerament més baixa a l'estàndard per a evitar aquest efecte advers (23).

Els pacients ancians amb una edat igual o superior als 70 anys representen un subgrup important i s'ha demostrat que presenten pitjor pronòstic global. A més, en aquest subgrup de pacients, la radioteràpia ha demostrat tenir poc impacte tant en la supervivència com en la qualitat de vida, de manera que el seu ús genera controvèrsies. No obstant això, la seva idoneïtat s'ha d'individualitzar (24-28).

1.3.3. Quimioteràpia

El tractament quimioteràpic estàndard inicial consisteix en l'administració de Temozolomida concomitant amb la radioteràpia, seguida de 6 cicles addicionals de

Temozolomida en monoteràpia. En general, és un fàrmac ben tolerat, però no està absent d'efectes adversos, els quals inclouen les náusees i la mielosupressió, especialment en forma de trombocitopènia i neutropènia, que són més freqüents durant la coadjuvència amb la radioteràpia (8).

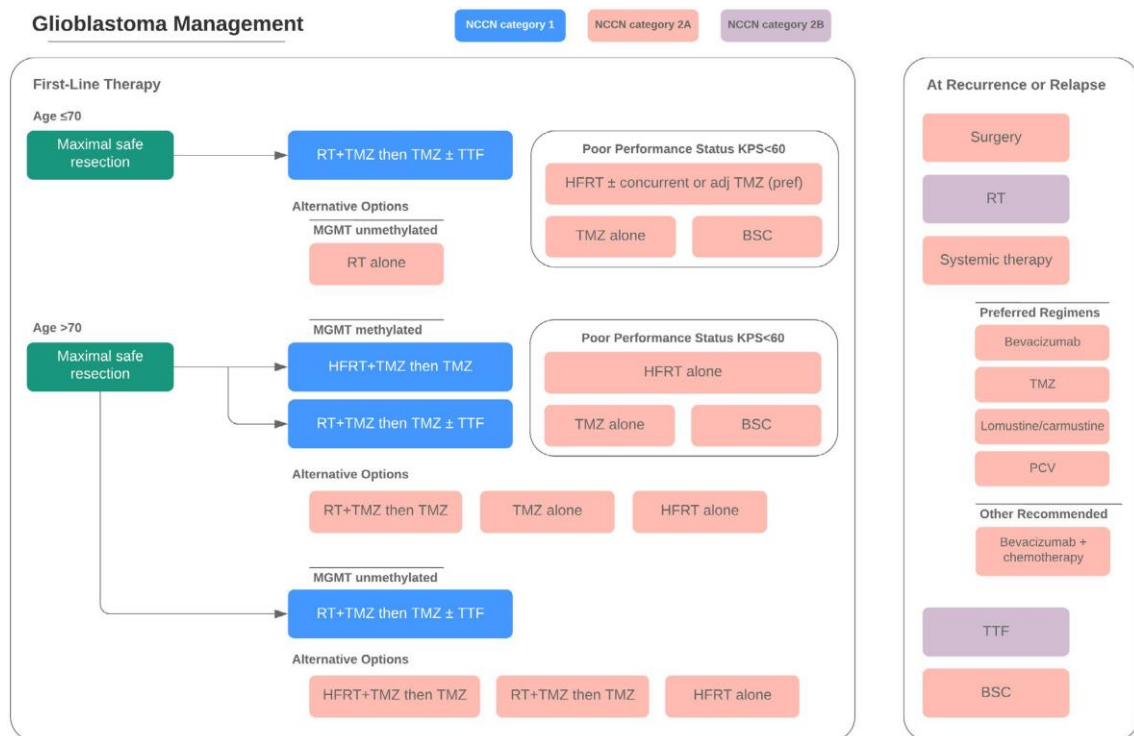
Gran part del benefici terapèutic de la Temozolomida està relacionat amb la metilació del promotor del gen MGMT (Metil guanina-ADN Metil-Transferasa), que el silencia. La MGMT és crucial en la reparació de l'ADN, la qual condiciona resistència a l'eficàcia de la Temozolomida enfront del teixit tumoral. És per això que la determinació de l'estat de metilació del promotor del gen MGMT és de gran importància per anticipar l'eficàcia terapèutica de la Temozolomida (29).

1.3.4. Altres teràpies sistèmiques

S'ha investigat el fet d'afegir Bevacizumab, un anticòs monoclonal humanitzat que inhibeix el VEGF ("Vascular Endothelial Growth Factor"), al tractament adjuvant estàndard. Tot i haver demostrat allargar la supervivència lliure de malaltia, no s'ha pogut evidenciar cap benefici en la supervivència global (30, 31).

No existeix cap teràpia sistèmica estàndard de segona línia en cas de recurrència o progressió tumoral. No obstant això, la més utilitzada inclou esquemes amb Lomustina, Carmustina i una reexposició a la Temozolomida. En general, els beneficis són modestos i els pacients que en poden obtenir seran probablement els que presentin la metilació del promotor MGMT (32-35).

A continuació (en la pàgina següent) es presenta un esquema que resumeix el tractament dels pacients afectats de GB.



Tan AC, Ashley DM, Lopez GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. CA Cancer J Clin. 2020;70(4):299-312 (36).

1.3.5. Teràpies locorregionals

Algunes teràpies locorregionals són aprovades com a tractament adjuvant en combinació amb la Temozolomida. Entre elles podem destacar la TTF o “Tumor Treating Fields”, la qual ha demostrat millorar la supervivència lliure de malaltia i la supervivència global en un assaig clínic de fase III. Malgrat l’aprovació i els resultats contrastats en aquest estudi, segueix havent-hi controvèrsia i debat sobre l’evidència real de la seva eficàcia, suscidades pel fet de no ser un estudi a doble cec i pel retard en l’aleatorització (37-40).

La TTF consisteix en la col·locació de transductors al cuir cabellut, els quals emeten polsos de corrent elèctric a una freqüència i intensitat determinades. L’aplicació ha de ser d’almenys 18 hores al dia. En general, és una teràpia ben tolerada, amb mínima toxicitat cutània. El principal problema és l’adherència terapèutica a causa de la llarga duració del tractament de forma diària, així com l’alt cost econòmic. Tot i això, es pot valorar en aquells pacients disposats i elegibles (37-40).

1.3.6. Teràpies de suport

A part de les opcions terapèutiques esmentades anteriorment, els pacients afectats de glioblastoma sovint experimenten simptomatologia neurològica significativa i progressiva al llarg del transcurs de la seva malaltia que pot ser tant a causa del tumor primari a conseqüència de les toxicitats del tractament (41).

Aquesta simptomatologia interfereix amb les activitats diàries dels pacients i, sovint, els incapaciten per treballar. A més, aquesta s'accentua de forma progressiva al llarg del transcurs de la malaltia i especialment al final de la vida, de manera que el suport assistencial té una importància primordial en l'enfocament multimodal de la gestió del glioblastoma (42).

Les crisis comicials poden ser freqüents i afectar fins al 80% dels pacients en algun moment del transcurs de la malaltia, fent que una gran quantitat d'ells acabi necessitant tractament anticomicial a llarg termini. El tractament anticomicial busca controlar les crisis amb la dosi més baixa possible d'antiepilèptic per tal de disminuir al màxim possible les interaccions entre medicaments així com el desenvolupament de possibles efectes adversos (43-46).

L'antiepilèptic Levetiracetam ha estat àmpliament estudiat per a tal finalitat en els pacients afectats de GB. És un fàrmac segur i amb poques interaccions amb altres medicaments comunament utilitzats en aquest grup de pacients. Cal destacar, però, que no es recomana l'ús profilàctic i rutinari de medicaments antiepileptics en els pacients sense història de crisis comicials tot i que és habitual el seu ús en el període preoperatori (43-46).

L'ús de corticoesteroides en el pacient afectat de GB és comú per tal de reduir l'edema vasogènic peritumoral i així aconseguir millorar la simptomatologia que se'n deriva. La dexametasona és el glucocorticoide més freqüentment utilitzat gràcies a la seva manca d'activitat mineralocorticoide (43, 47-49).

Cal tenir en compte que els efectes adversos limiten l'ús a llarg termini dels glucocorticoides, per la qual cosa es recomana l'ús de la menor dosi possible durant el menor temps possible. A més, existeix certa evidència en què l'ús de corticoesteroides pot estar associada a una menor supervivència possiblement relacionada amb el seu efecte

“protector tumoral” davant l’estrès citotòxic induït per la radioteràpia i la quimioteràpia (43, 47-49).

Tant el glioblastoma com altres gliomes d’alt grau confereixen un elevat risc de tromboembòlies venoses, ja que indueixen, entre altres factors associats, un estat d’hipercoagulabilitat al pacient (47-52).

Els pacients tenen un risc del 20% anual de presentar almenys un episodi de tromboembolisme venós. Els principals factors que en propicien l’aparició és l’augment de l’activació dels factors de coagulació i de la trombina en el glioblastoma, la necessitat de procediments neuroquirúrgics i les altes taxes de limitació de la mobilitat dels malalts (47-52).

Es recomana l’inici de la profilaxi enfront de la tromboembòlia venosa amb heparina de baix pes molecular a les 24 h de la cirurgia i mantenir-la en el període peroperatori. Generalment, no es recomana la profilaxi perllongada després del període peroperatori, ja que augmenta el risc d’hemorràgia intracranial (47-52).

Cal destacar que, en cas de tromboembolisme venós, es recomana, una vegada finalitzat el tractament anticoagulant oportú, la profilaxi secundària vitalícia amb heparina de baix pes molecular llevat contraindicacions. Actualment, no hi ha suficient evidència a favor de l’ús dels nous anticoagulants orals per a tal finalitat (47-52).

La limfopènia és comuna en els pacients afectes de GB especialment a conseqüència de l’ús de corticoesteroides, la quimioteràpia amb Temozolomida i la radioteràpia, ja que cadascuna d’aquestes modalitats terapèutiques provoca toxicitat limfocitària. Com a conseqüència, durant el tractament quimioteràpic i radioteràpic concurrent en el pacient diagnosticat i intervingut de GB recent, existeix risc d’infeccions oportunistes com és el cas del *Pneumocistis jirovecii*, per la qual cosa es recomana la profilaxi davant d’aquesta (53).

1.3.7. Cures pal·liatives

Actualment, a més, s’està reconeixent cada vegada més la importància de la implicació activa i precoç dels serveis de cures pal·liatives a mesura que millora la consciència de la complexitat en les cures dels pacients amb glioblastoma i, també, dels seus cuidadors (50).

La gestió òptima dels símptomes com la fatiga, els trastorns de l'estat d'ànim i del comportament, i la disminució de la cognició, així com la planificació de cures avançades, són components crucials per tal de millorar la qualitat de vida i reduir la càrrega simptomàtica dels pacients (50).

1.4. Futur

Tot i els avenços en el tractament del glioblastoma, les taxes de supervivència al cap de 5 anys segueixen essent inferiors al 10%. Per això, hi ha una necessitat evident en el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques com la immunoteràpia, els TTF, la termoteràpia intersticial induïda per làser (LITT), la teràpia hipertèrmica magnètica (MHT), la ultrasonografia focalitzada, les radiofreqüències per microones i la teràpia fotodinàmica (TFD) (54-59).

D'entre totes elles, en aquesta tesi doctoral ens centrarem en la teràpia fotodinàmica, ja que pot jugar un paper important tant com a tractament coadjuvant durant la resecció quirúrgica, com a tractament adjuvant a la quimioteràpia i la radioteràpia en cas dels pacients no tributaris a resecció quirúrgica, o com a tractament de rescat en aquells pacients amb recurrència que no són tributari a rescat quirúrgic (54-59).

2. Teràpia fotodinàmica

2.1. Orígens

La teràpia fotodinàmica va ser descoberta pels antics habitants de les civilitzacions grega, egípcia i índia. Inicialment, aquestes civilitzacions creien que la llum per si sola podia ser útil pel tractament de certes malalties com el vitiligen, el raquitisme, la psoriasi i el càncer cutani (54).

No va ser fins al segle XX, però, que es va començar a utilitzar algun producte químic com a agent fotosensibilitzant que juntament amb la llum pot ser utilitzat amb finalitats terapèutiques (54).

La TFD consisteix, doncs, en la introducció d'aquest agent fotosensibilitzant dins el cos (ja sigui per via endovenosa, intraperitoneal, tòpica o oral); aquest agent s'activa o respon a l'energia lumínica a una longitud d'ona específica generant molècules reactives d'oxigen; radicals lliures d'oxigen (ROS), induint dany cel·lular secundari (60).

L'agent fotosensibilitzant utilitzat dependrà de l'estirp cel·lular objectiu. Aquest s'acumula a intracel·lularment de forma específica, s'activa en aplicar l'energia lluminosa i indueix el dany cel·lular secundari tal com s'ha descrit prèviament.

L'alteració en la homeòstasi cel·lular provocada pels ROS es tradueix en la mort de les cèl·lules diana (tumorals) generalment a través de la necrosi o l'apoptosi, així com la destrucció de l'aortació vascular tumoral.

La curta distància de migració dels ROS juntament amb la seva curta vida permet que la TFD danyi principalment les cèl·lules tumorals, evitant malmetre els teixits adjacents (55, 56, 60, 61).

2.2. Mecanismes de mort cel·lular induïts per la TFD

S'han descrit diversos mecanismes de citotoxicitat associats a la teràpia fotodinàmica, inclosa d'activació de vies de mort i supervivència cel·lular com són la necrosi, l'apoptosi, l'autofàgia, la necroptosi i la paraptosi (62).

La necrosi cel·lular sol estar relacionada amb el dany induït per altes dosis de TFD mentre que l'apoptosi sol estar relacionada amb l'alliberació del citocrom C així com l'activació del Bcl-2 i la supressió del NFkB. Aquestes vies apoptòtiques s'activen a menor dosi lumínica en comparació amb la necrosi (63, 64).

A part dels seus efectes citotòxics directes, la TFD pot provocar la destrucció la microvasculatura tumoral, potenciant la inanició d'aquest per la falta tant d'oxigen com de nutrients essencials. A més, s'ha descrit que la TFD pot provocar la mort cel·lular immunomediada gràcies a la seva capacitat de fomentar l'activació i la vigilància immunològica, la qual cosa pot contribuir al control tumoral a llarg termini (65).

2.3. Efectes immunomoduladors de la TFD

La TFD té un efecte significatiu sobre el sistema immunitari, principalment a causa de la seva capacitat d'incrementar la resposta immunitària del subjecte enfront del càncer. La lesió induïda per la TFD a les cèl·lules tumorals allibera una barreja d'antígens tumorals i altres senyals que activen tant el sistema immunitari innat com l'adaptatiu (66).

2.4. Àcid 5-Aminolevulínic com a fotosensibilitzador

El fotosensibilitzador ideal per a la seva utilització en tumors cerebrals ha de complir una sèrie de característiques: Absència de toxicitat sistèmica, acumulació en altes concentracions al teixit tumoral i activar-se a una longitud d'ona lumínica que permeti la penetració en profunditat al teixit cerebral sense ser tòxic pel parènquima circumdant. En el cas del GB, el fotosensibilitzador que compleix totes les característiques esmentades és l'àcid 5-Aminolevulínic (5-ALA) (67, 68).

El 5-ALA és un aminoàcid no-proteic format a partir de la condensació del succinil-CoA i la glicina. Actua com a precursor metabòlic en la biosíntesi del grup Hem. Per si sol, el 5-ALA no té activitat com a fotosensibilitzador, però és dins les cèl·lules tumorals, concretament dins la mitocondria, on el 5-ALA es converteix en protoporfirina IX (PpIX), metabòlit amb capacitat com a fotosensibilitzador i precursor directe de l'hemoglobina en la via de la síntesi del grup Hem (67).

La disminució de l'expressió de l'enzim ferroquelatasa en les cèl·lules del GB juntament amb l'expressió diferencial de l'enzim porfobilinogen desaminasa (PBGD) entre les cèl·lules del GB i les normals, explica la selectivitat en la producció i acumulació de la PpIX en les cèl·lules neoplàsiques (69, 70).

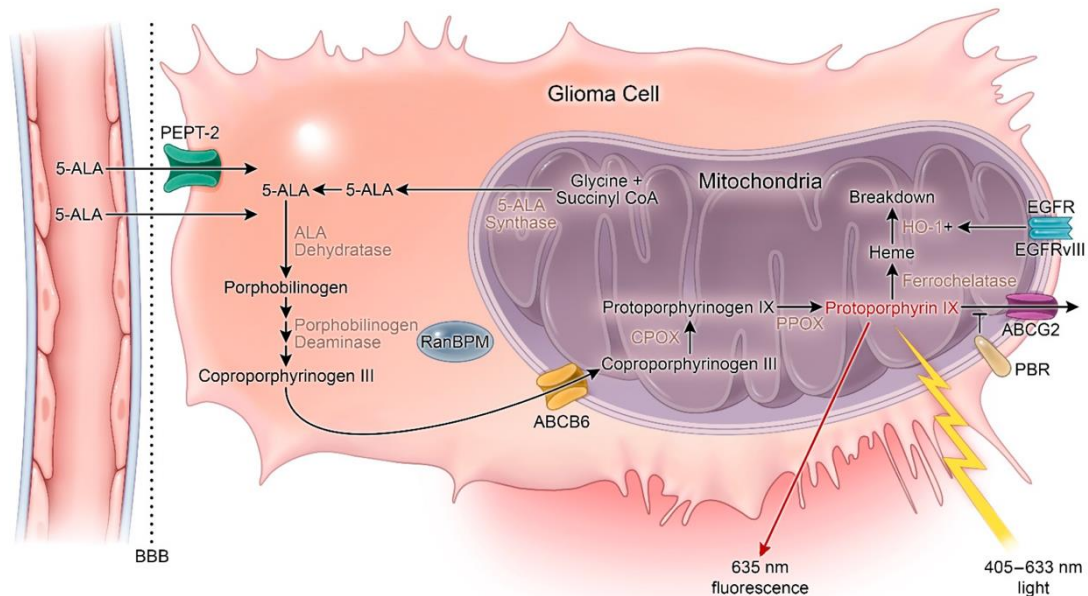


Figure 1. Heme synthesis pathway and mechanism of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) fluorescence. 5-ALA: 5-aminolevulinic acid; ABCG2: ATP-binding cassette G2; ABCB6: ATP-binding cassette B6; BBB: Blood-brain barrier; CPOX: Coproporphyrinogen oxidase; HO-1: Heme-oxygenase 1; PBR: Peripheral benzodiazepine receptor; PPOX: Protoporphyrinogen oxidase. + = increased activity.

Traylor JI, Pernik MN, Sternisha AC, McBrayer SK, Abdullah KG. Molecular and Metabolic Mechanisms Underlying Selective 5-Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence in Gliomas. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3) (71)

Com a fotosensibilitzador, la PpIX s'excita amb llum en un rang de longitud d'ona d'entre 405 (color violeta) i 633 nm (color vermell) (72-74).

Les propietats fluorescents del 5-ALA/PpIX s'han utilitzat per al tractament dels glioblastomes mitjançant la cirurgia guiada per fluorescència (activada amb llum blava/violeta; amb una longitud d'ona més propera als 405 nm) i, més recentment, s'està investigant el seu ús terapèutic en estimular-la amb llum vermella (activada amb una longitud d'ona més propera als 650 nm; la qual presenta una millor penetrància tissular podent arribar fins al centímetre de profunditat) (72-74).

El 5-ALA, a més, té l'avantatge que pot ser administrat via oral i el seu ús en la cirurgia guiada per fluorescència en el tractament del GB s'ha convertit pràcticament en un indispensable en els últims anys, ja que s'ha demostrat una major extirpació tumoral així com supervivència lliure de progressió (SLP) en comparar-la amb la microcirurgia convencional (15, 75). La fluorescència vermella/rosada de la PpIX permet una delimitació i diferenciació més precisa del teixit tumoral respecte al teixit normal sempre

que s'utilitzin els microscopis quirúrgics equipats amb les fonts lluminoses i filtres corresponents (55).

Adicionalment, s'ha demostrat que la fluorescència del teixit associada al 5-ALA durant la cirurgia guiada per fluorescència té uns valors de sensibilitat, especificitat i predictius positius excepcionalment elevats per a identificar el teixit tumoral del GB (73).

2.5. Situació actual de la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA

Fins al dia d'avui, s'han realitzat diversos estudis de laboratori on s'avaluen dades d'eficàcia de la TFD amb 5-ALA pel tractament del GB, s'han provat diferents exposicions de llum i de fàrmac i s'ha analitzat la selectivitat de la TFD per a les cèl·lules tumorals en comparació amb els teixits/cèl·lules normals o els teixits edematosos.

Igualment, s'han desenvolupat alguns estudis amb animals per tal de provar les tècniques de distribució de la llum als gliomes d'alt grau, com ara la il·luminació del tumor quirúrgicament exposat, així com la col·locació intersticial de les fibres de llum.

Finalment, s'han desenvolupant estudis clínics prospectius, especialment sèries de casos, on s'analitzen les dades preliminars de l'eficàcia i seguretat de la TFD en pacients als qui s'utilitza com a teràpia compassiva.

2.5.1. Estudis “in vitro”

La recerca bàsica en la TFD amb 5-ALA ha evolucionat en les dues últimes dècades, intentant resoldre diferents qüestions sobre la seva aplicació en el GB. Diversos autors han publicat diversos manuscrits utilitzant diferents models d'estudi in vitro amb gliomes. Aquests tracten diferents temes entre els quals destaquen: l'esquema de tractament òptim, els potenciadors i inhibidors de la TFD mitjançant 5-ALA, els canvis fisiològics i biomolculars en la TFD, la mort cel·lular induïda per la TFD, les cèl·lules mare de glioma (també conegudes com a GIC; “Glioma Initiating Cells”) i la TFD, i la resistència a la TFD.

2.5.1.1. Esquema terapèutic òptim

Com moltes altres teràpies, la TFD mitjançant 5-ALA implica la cerca d'un règim d'aplicació òptim per aconseguir el màxim efecte sobre les cèl·lules tumorals amb un mínim impacte sobre les sanes.

Diferents estudis han avaluat, en termes de fluència de llum i taxa de fluència lumínica, les millors dosis de llum in vitro per a la TFD.

Medsen et al. van realitzar els primers estudis que trobem en la literatura sobre aquest tema. L'any 2000, aquest grup va publicar tres manuscrits on es va observar que la llum amb una longitud d'ona de 635 nm administrada a baixes dosis (menys de 50 J/cm²) i multifraccionada (taxa de fluència lumínica baixa de 10-25 mW/cm²) era la més eficaç en induir la mort cel·lular. Addicionalment, van descriure la supressió del creixement d'esferoides de glioma durant la TFD (76).

L'any 2006, Hirshberg et al. van observar, a través d'una matriu de col·lagen combinada amb esferoides de glioma tumorals, la inhibició de la migració amb una fluència baixa de 6 J/cm² i la citotoxicitat amb una fluència alta de 25 J/cm². Les taxes de fluència baixa inhibeixen de manera efectiva la infiltració de les cèl·lules tumorals (77).

Posteriorment, Mathews et al. van utilitzar taxes de fluència lumínica ultra baixes i van observar que generaven una inhibició significativa del creixement dels esferoides, però no van ser capaços de detectar un límit inferior en la taxa de fluència a partir del qual deixi d'inhibir el creixement dels esferoides tumorals (78).

L'any 2010, Singh et al. van definir, en el seu protocol, que la teràpia metronòmica ofereix millors resultats en l'apoptosi de les cèl·lules tumorals quan es compara amb l'esquema terapèutic agut (79).

Un estudi interessant va ser, a més, el realitzat per Lou et al. l'any 2014, ja que van descriure un sistema d'alt rendiment per provar gairebé 1000 condicions diferents de TFD de forma paral·lela. Aquesta plataforma pot ser d'ajuda en el desenvolupament de nous fotosensibilitzadors i en l'optimització dels protocols actuals de TFD. La seva aplicació hauria de ser considerada en la cerca del millor règim de tractament (80).

2.5.1.2. Potenciadors i inhibidors de la TFD amb 5-ALA

Un dels primers modificadors de l'efecte de la TFD investigats va ser la temperatura. L'any 2004, Hirschberg et al. van estudiar l'impacte de la hipertèrmia (40-46 graus Celsius) i el sinergisme amb la TFD mitjançant 5-ALA. En aquest estudi van observar un augment de l'apoptosi de les cèl·lules tumorals en esferoides de glioma quan combinaven ambdós processos (63).

És conegut que la síntesi del grup hem a partir de la PpIX depèn de la inserció del ferro per part de l'enzim ferroquelatasa. Tenint en compte aquesta premissa, alguns estudis han associat quelants de ferro a la TFD amb 5-ALA demostrant que pot augmentar la concentració intracel·lular de PpIX en les cèl·lules tumorals (70).

Un altre camp interessant ha sigut l'estudi de la interacció entre la TFD i diversos medicaments que se solen administrar en pacients afectats de GB. L'any 2012, Hefti M. et al. van estudiar si el Levetiracetam i la Fenitoïna podrien reduir l'acumulació cel·lular PpIX en pacients amb gliomes d'alt grau. Es va observar que la Fenitoïna disminuïa les concentracions de PpIX en pacients amb gliomes d'alt grau però que el Levetiracetam, no (81).

Posteriorment, l'any 2016, J.E. Lawrence et al. van analitzar el paper de la dexametasona, la Desipramina, la Fenitoïna, l'Àcid Valproic i el Levetiracetam. Tots aquests medicaments, llevat del Levetiracetam, reduïen la quantitat total de PpIX produïda per les cèl·lules de GB (82).

Finalment, l'any 2019, Shi et al. van demostrar el potencial de la metadona per influir en l'efecte citotòxic de la TFD amb 5-ALA tant pel carcinoma escamós com per les línies cel·lulars del GB (83).

Un altre objectiu prometedor per tal d'aconseguir millors resultats de la TFD amb 5-ALA és modular el transport de la PpIX dins les cèl·lules glials actuant sobre els seus transportadors ABC ("ATP-binding cassette").

L'any 2013, Sun W. Et al. van explorar el paper del Gefitinib per a tal finalitat. La disminució dels nivells d'ABCB6 en el metabolisme del 5-ALA i l'acumulació de PpIX en el glioma. La sobreexpressió d'ABCB6 és una possible estratègia per millorar l'acumulació intracel·lular de PpIX i així optimitzar la discriminació subjectiva de la

fluorescència feble, la qual cosa ens permet millorar l'eficàcia de la TFD amb 5-ALA (84, 85).

L'any 2019, N Kawai et al. també va estudiar la importància de l'ABCG2. Es va observar que si aquest transportador tenia els nivells més alts, l'efecte del marcatge amb 5-ALA i la TFD serien menys efectius (86).

Un any més tard, P. Muller et al. van demostrar que les cèl·lules de GB amb una alta expressió d'ABCG2 acumulen menys fotosensibilitzador i necessiten dosis lluminoses més altes per tal de ser eliminades (87). La inhibició de l'ABCG2 durant l'acumulació de fotosensibilitzador i la irradiació promet restaurar la susceptibilitat completa d'aquesta població crucial de cèl·lules tumorals a la teràpia fotodinàmica (87).

Finalment, Mansi et al. l'any 2022 van determinar l'activitat de la FECH i l'ABCG2 i els van correlacionar amb els nivells intracel·lulars i extracel·lulars de PpIX i la resposta a la TFD. Van revelar que l'ABCG2 actua com a determinant biològic essencial de la fluorescència de PpIX a les cèl·lules de glioma. En aquest context van suggerir la inhibició de l'ABCG2 amb lapatinib com a estratègia terapèutica prometedora. La inhibició de la ferroquelatasa i els quelants de ferro, en canvi, no van ser efectius (88).

Les concentracions d'oxigen són crucials per tal d'aconseguir l'efecte citotòxic de la TFD.

El 2014, Albert et al. van descriure que les línies cel·lulars de glioma cultivades sota concentracions d'oxigen atmosfèric (pO_2 del 19%) i fisiològiques (pO_2 del 9%) requerien diferents dosis lumíniques per tal de generar l'efecte fotodinàmic. Van observar que, amb pO_2 fisiològic, les dosis de llum requerides eren un 20% més altes que amb les concentracions d' O_2 atmosfèric (89).

Recentment, Fahey et al. el 2016 van estudiar l'Òxid Nítric Sintasa (ONS) com a potenciador de la TFD amb 5-ALA en el GB. Van observar que l'extensió de l'apoptosi induïda la TFD augmentava substancialment quan hi havia un inhibidor de la ONS o un captador d'òxid nítric (ON). L'ús d'inhibidors de la ONS podria augmentar l'efecte de la TFD mitjançant 5-ALA (90).

2.5.1.3. TFD amb 5-ALA i GIC (“Glioma Initiating Cells” o “Glioma Stem Cells”)

Les cèl·lules mare de glioma o cèl·lules iniciadores de glioma (GIC) son una població de cèl·lules tumorals amb capacitat per autorenovar-se i diferenciar-se, generant resistència i recurrència de la neoplàsia després del tractament. Estudis recents s’han centrat en experiments in vitro basats en aquestes cèl·lules mare (91).

L’any 2016, Schimanski et al. van informar per primera vegada que les GIC acumulen PpIX quan són sotmeses al 5-ALA i, a més, són sensibles a la TFD amb 5-ALA (91).

L’any 2017, Wang et al. van explicar com el quelant del ferro era necessària per a la producció de PpIX i la fluorescència a les cèl·lules mare del Glioma. Van detectar, a més, una població lateral de cèl·lules mare amb baixa producció de PpIX i una expressió més alta de l’hemooxigenasa-1, cosa que explicava els baixos nivells de PpIX. La quelació del ferro mitjançant la deferoxamina va augmentar la producció de PpIX en aquest subgrup de cèl·lules (92).

El mateix any 2017, Fujishiro et al. van comparar les cèl·lules mare del glioma amb cèl·lules mare parentals i van descobrir que les GIC expressaven nivells més alts d’ARN missatger d’enzims de biosíntesi de PpIX i transportadors com el PEPT1/2 i ABCB6. A més, les GIC acumulaven nivells més alts de PpIX quan s’incubaven amb 5-ALA i eren més sensibles a la TFD amb 5-ALA en comparació amb les cèl·lules mare parentals (93).

Finalment, Ihata et al. van utilitzar diverses línies de GIC, incloent-hi els tipus mesenquimals i proneurals, per tal d’investigar la seva resposta a la TFD amb 5-ALA. Van descobrir que les GIC en situació d’hipòxia tenien una menor acumulació intracel·lular de PpIX a causa de l’augment de l’expressió gènica de la ferroquelatasa, però continuaven essent sensibles a la TFD amb 5-ALA. L’estudi suggeria, doncs, que la TFD amb 5-ALA podria continuar sent efectiva enfront de les GIC tolerants a la hipòxia (94).

2.5.1.4. Resistència a la TFD

Només hi ha un estudi de Vílchez et al. datat el 2021 que es va centrar en la resistència a la TFD. Els autors van obtenir cèl·lules resistents que acumulaven menys fotosensibilitzador, formaven esferes tumorals amb un major nombre de cèl·lules, tenien major capacitat tumorigènica i expressaven nivells més elevats d’ARN missatger del

receptor del creixement fibroblàstic (FGFR), el receptor el factor de creixement epidermoide (EGFR) i el receptor del factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGFR) en comparació amb les cèl·lules progenitores (95).

L'any 2022, Mastrangelopoulou et al. van proporcionar un estudi in vitro on es va aplicar la TFD amb 5-ALA a línies cel·lulars de GB i càncer de mama. Van determinar que els nivells d'ABCG2, FECH (ferroquelatasa) i òxid de ferro (HO-1) són predictors de l'eficàcia de la TFD amb 5-ALA. Les línies cel·lulars de GB van demostrar ser més resistents a la TFD en comparació amb les cèl·lules de càncer de mama. Pel que fa al GB, la inhibició dels transportadors d'ABCG2 potencia l'eficàcia de la TFD en totes les línies cel·lulars de GB estudiades, mentre que la inhibició de la FECH i HO-1 només va ser efectiva en potenciar la TFD en una sola línia cel·lular de les estudiades. Conclouen, doncs, que la inhibició d'aquests objectius moleculars podria potenciar l'eficàcia de la TFD amb 5-ALA al superar certes barreres de resistència cel·lulars envers aquesta (95).

2.5.1.5. Models innovadors del binomi organoides cerebrals i GB

Amb la intenció de crear models in vitro més realistes, el nostre grup de treball ha publicat recentment l'aplicació de la TFD mitjançant 5-ALA a òrgans cerebrals infiltrats per tumorosferes de cèl·lules mare de GB (96).

Aquest model ajuda a comprendre millor el procés de lesió selectiva i crear una presentació més realista en 3D (96).

El nostre grup ha demostrat que aquest potent avatar del càncer permet estudiar l'eficàcia dels diferents enfocaments terapèutics, representar la simbiosi entre les cèl·lules normals i les cèl·lules tumorals, i proporcionar una veritable visió de la interacció amb l'entorn microambiental del tumor (96).

Segons els experiments realitzats in vitro, sembla que la TFD es dirigeix específicament a les cèl·lules de GB mentre respecta el teixit cerebral normal circumdant. Aquest model forma part de la present tesi doctoral i s'ampliarà més endavant (96).

2.5.2. Recerca translacional

La recerca translacional de la TFD amb 5-ALA, basada en estudis "in vivo", s'ha desenvolupat gairebé de forma paral·lela amb la recerca bàsica. Els autors han publicat

estudis experimentals amb animals que aborden diferents temes com ara les característiques del model animal, l'esquema terapèutic òptim, els efectes de la TFD envers les cèl·lules del GB i la seva selectivitat a l'hora de preservar les cèl·lules normals, així com els potenciadors i inhibidors de la TFD.

2.5.2.1. Característiques del model animal

En experimentar amb models “in vivo”, és essencial simular, tant com sigui possible, les condicions finals de l'objectiu terapèutic. Aquests models combinen teixit normal amb cèl·lules de GB pretenen demostrar la mort cel·lular produïda per TFD, evitant el dany al teixit normal.

El 2004, l'equip de Moriyama et al. va demostrar, per primera vegada, l'ús de la bioluminescència (BLI) mitjançant la transferència cel·lular de luciferasa per tal de detectar l'efecte de la TFD amb 5-ALA en cèl·lules tumorals de gliosarcoma que infiltraven el cervell de ratolins. La bioluminescència va resultar ser una mesura valuosa com a punt de resposta final al tractament (97).

L'any 2006, Madsen et al. van utilitzar un model d'animal on és co-cultivava el teixit encefàlic de ratolí amb cèl·lules glials tumorals preincubades “in vitro” amb 5-ALA. Aquestes cèl·lules van mostrar una disminució de la supervivència en resposta a la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA. A més, van demostrar que altes dosis lumíniques (26 Joules) lliurades a potències relativament baixes (10 mili Watts) podia produir edema cerebral (98).

El model “in vivo” ha evolucionat cap a una plataforma on no només ens permet investigar sobre l'efecte directe de la teràpia fotodinàmica enfront de les cèl·lules de GB, sinó que també ens permet estudiar-ne altres aplicacions terapèutiques.

L'any 2019, Zhang et al. van explorar l'ús de la TFD amb 5-ALA per tal d'aconseguir l'obertura de la barrera hematoencefàlica en ratolins. Van observar una interrupció més pronunciada de la barrera induïda per la TFD en ratolins joves vs. Adults. Aquestes troballes són interessants, ja que obren la possibilitat d'aplicar la TFD com a mètode per a l'administració de medicaments al cervell, especialment pel tractament postquirúrgic dels gliomes malignes (99).

Finalment, Teh et al., l'any 2021 van avaluar la TFD administrada de forma crònica basada en infraroig proper. Això es va aconseguir de manera desvinculada i no invasiva en un model de xenotrasplantament de GB en ratolí (100).

2.5.2.2. Esquema terapèutic òptim

Tal com hem vist anteriorment, l'esquema terapèutic òptim s'ha començat a investigar en els últims temps, també mitjançant estudis translacionals.

L'any 2006, Angel-Petersen et al. van informar en un model de GB de ratolí on el tractament de la TFD amb 5-ALA induïa una pronunciada necrosi cel·lular només si la llum es lliurava a baixa intensitat. El tractament, en aquest cas, va allargar la supervivència dels animals al tumor (101).

El mateix any, Hirschberg et al. van demostrar que l'eficàcia de la TFD amb 5-ALA es veia incrementada si aquesta s'administrava de forma repetitiva i el tractament es feia a baixes dosis i intensitat lumínica (102).

L'any 2015, Guo et al. van utilitzar un díode emissor de llum orgànic en ratolins amb una baixa taxa d'intensitat i dosi lumínica però amb llarga durada del tractament, podent demostrar una major taxa de supervivència en el grup terapèutic enfront del grup control. A més, aquest grup va definir els índexs dosimètrics per tal de mesurar l'oxigenació del teixit i la fluorescència, la qual cosa ajudaria a millorar encara més els plans de tractament (103).

Un any més tard, Tetard et al. van estudiar un model reproducible i fiable de TFD intersticial amb 5-ALA en ratolins. Les taxes de fluència baixes es toleraven millor i el lliurament fraccionat acabava provocant més necrosi. No obstant això, van concloure que s'haurien d'estudiar més esquemes de fraccionament terapèutic (104).

Més endavant, l'any 2017, Leroy et al. van observar que en el glioma humà inserit a cervells de ratolí, l'eficàcia més gran amb el lliurament de llum fraccionat podria ser degut a la reoxigenació per intervals dels teixits. Van utilitzar una fibra òptica intratumoral i van comparar tres grups: sense llum, dues i cinc fraccions. Van evidenciar que en el grup de 5 fraccions es produïa més apoptosi i neovascularització. També van observar, que en els dos grups amb llum es produïa edema i infiltració de macròfags (105).

Finalment, Vermandel et al. l'any 2019 van estudiar diversos esquemes de tractament fraccionat. Van observar que el grup de 5 fraccions i de baixa taxa de fluència lumínica tenia la mateixa resposta cel·lular però amb menor toxicitat i edema cerebral (106).

2.5.2.3. Efectes de la TFD sobre el teixit cerebral normal

Estudiar si la TFD amb 5-ALA té efectes sobre el teixit cerebral normal és important per tal de poder aplicar aquest tractament amb seguretat als pacients.

El primer estudi que va analitzar aquest tema el va realitzar Ito et al. l'any 2005. Van utilitzar cèl·lules de glioma, les van inserir a cervells de ratolí i van descriure l'edema produït després de la TFD amb 5-ALA. Els autors van observar que la TFD amb 5-ALA produeix edema en el parènquima cerebral, però es contraresta parcialment amb el tractament amb glucocorticoides (107).

Amb relació a l'edema cerebral, Mathews et al., l'any 2011 també van estudiar aquest efecte després de la TFD. Van aplicar dosis creixents de llum làser i van monitorar l'edema cerebral amb seqüències T2 de RM. L'edema induït era de tipus vasogènic i responia al tractament corticoides (108).

Un altre estudi interessant sobre el mecanisme de la TFD es va publicar l'any 2015 per Yi et al., els quals van utilitzar cèl·lules de glioma implantades subcutàniament en ratolins. Van comparar tres grups tractats (A) o no tractats (B i C) amb TFD amb 5-ALA. El grup tractat va mostrar més necrosi, menys densitat microvascular i la mateixa apoptosi quan es va aplicar la TFD en comparació amb els altres grups. Es proposa que la necrosi per lesió microvascular és un dels mecanismes de la TFD amb 5-ALA en el tractament del GB (109).

Kimura et al., l'any 2017, van estudiar els efectes de la TFD amb 5-ALA en el teixit cerebral normal "in vivo". El model de ratolí va determinar que la seguretat s'aconsegueix amb irradiació de llum inferior a 100 J/ cm² i dosis menors a 90 mg/kg. Per sobre d'aquestes dosis, es va observar la ruptura de la barrera hematoencefàlica i l'aparició d'edema cerebral (110).

Finalment, també l'any 2017, Leroy et al., van determinar que les seqüències de difusió i perfusió de la RM permetien revelar lesions histològiques després de la TFD. La TFD intersticial va induir lesions específiques en el teixit tumoral, que es van observar en la

RM i es van confirmar en les anàlisis anatomopatològiques posteriors. És així, doncs, que la RM pot proporcionar una eina no invasiva i fiable per avaluar els resultats del tractament després de la TFD, així com descartar alteracions del parènquima cerebral normal (105).

2.5.2.4. Potenciadors i inhibidors

Actualment, existeix una manca de literatura sobre potenciadors i inhibidors de la TFD amb 5-ALA i els seus efectes quan s'estudia en models "in vivo". L'any 2017, Fischer et al., van introduir un estudi sobre la hipotèrmia i la TFD. En aquest, van descobrir que els beneficis de la hipotèrmia eren un augment de la fluorescència de la PpIX, una millora en la supervivència de rates i la protecció d'estructures cerebrals. Aquests beneficis podrien comportar millores significatives en els resultats dels pacients (111).

2.5.2.5. Teràpies combinades

Recentment, Yonsei et al., van publicar un estudi interessant sobre els efectes combinats de la teràpia sonodinàmica i la teràpia fotodinàmica pel glioblastoma. Van utilitzar un model de ratolí al qual se li van inocular cèl·lules de glioma per tal de comparar la teràpia fotodinàmica, la sonodinàmica i la sonofotodinàmica. Van observar que la teràpia fotodinàmica per si sola podia inhibir el creixement del GB, mentre que els ultrasons no podien generar aquest efecte. Pel que fa a la combinació de les dues teràpies, els autors van descriure un augment en els paràmetres d'estrès oxidatiu en comparació amb la TFD sola (112).

2.5.3. Estudis clínics

Fins a l'actualitat, s'han realitzat alguns estudis experimentals en relació amb la TFD mitjançant 5-ALA en pacients afectats de GB. La majoria d'aquests són de tipus descriptiu a excepció d'una cohort retrospectiva.

L'any 2007, Beck et al. van publicar els primers estudis clínics sobre la TFD amb 5-ALA. Van avaluar dues sèries de pacients amb petites recurrències de GB que van ser sotmesos a TFD intersticial amb 5-ALA (col·locant fins a sis difusors de llum cilíndrics via estereotàctica, prèvia planificació de la distribució lumínica i tèrmica en tres dimensions). La fluència total de llum aplicada va ser 4.320 a 11.520 J amb un feix làser de longitud d'ona de 633 nanòmetres. No es van informar efectes adversos, i la supervivència mitjana

d'aquests pacients va ser de 15 mesos. Els autors van estudiar la concentració de PpIX en el GB vs. Cortical, trobant un augment de 100 vegades més de PpIX en el glioma. També es va estudiar el "Photobleaching", el qual correspon a la pèrdua progressiva de les propietats lumíniques d'una molècula fluorescent, comprovant que era major amb dosis altes de fluència lumínica (74).

Un any després, Ejamel et al., van informar d'un estudi clínic en què es van reclutar 27 pacients. Tretze van ser exposats a una combinació de PpIX i 5-ALA i van ser sotmesos a TFD repetitiva després de la resecció quirúrgica guiada amb fluorescència. Van utilitzar un globus que s'expandia a la mida de la cavitat per tal d'administrar la fluència lumínica planificada en el grup de tractament. Aquests pacients es van comparar amb un grup control, determinant un augment de la supervivència de 52,8 setmanes vs. 24,6 a favor del grup experimental, així com millors puntuacions mitjanes en les escales que valoren l'estat funcional, també a favor del grup experimental. A més, el temps lliure de progressió també va ser major al grup experimental (113).

L'any 2008, Stummer et al., van informar d'un cas en què es va tractar una petita recurrència d'una lesió en un pacient afectat de GB refractari als tractaments de segona línia. Després de la TFD amb 5-ALA, el pacient va aconseguir estar lliure de malaltia durant 56 mesos (114).

Henning et al., l'any 2011 van descriure un mètode per calcular com es consumeix el fotosensibilitzador (el "photobleaching" ja mencionat amb anterioritat) durant la TFD intersticial. Amb l'estudi van aconseguir individualitzar l'exposició lumínica durant l'aplicació de la TFD (115).

L'any 2013, Johansson et al., van publicar un estudi amb relació a la TFD i el "photobleaching", on cinc pacients amb GB no extirpable van ser tractats amb TFD intersticial mitjançant 5-ALA. Les majors concentracions intratumorals de PpIX es van relacionar amb major intensitat de la fluorescència i menor "photobleaching" (116).

L'any 2020, Shipmann et al., van estudiar la TFD amb 5-ALA en 20 pacients amb recurrència de GB. Aquests van ser sotmesos a la TFD intersticial durant 60 minuts (longitud d'ona de 635 nanòmetres i 200 mW/cm de potència). Es va observar una infecció al llit quirúrgic com a únic efecte advers. La RM postoperatòria va revelar edema citotòxic al voltant de la cavitat en un 80% dels pacients tot i que va ser selectiu pel teixit

tumoral infiltrant i el tumor no ressecat. En aquests pacients, es va aconseguir una mitjana de supervivència lliure de progressió de sis mesos. Aquests resultats prometedors suggereixen que la TFD podria ser útil en la recurrència tumoral, millorant la supervivència lliure de progressió en aquests pacients tot i que són indispensables més estudis (117).

L'any 2021, Vermandel et al., van descriure resultats preliminars del mateix estudi, l'INDIGO. Es van avaluar deu pacients amb GB de diagnòstic recent. Van sotmetre's a TFD intraoperatòria i no es van detectar efectes adversos greus o inesperats. També, es van analitzar variables preliminars d'evolució clínica, obtenint una supervivència lliure de progressió de 17,1 mesos i una supervivència global mitjana de 23,1 mesos. Van acabar conclouent que la TFD associada al tractament estàndard del GB és segura i fiable i podria ajudar a disminuir la progressió tumoral després de la resecció quirúrgica màxima (118).

El mateix any 2021, es van realitzar algunes sèries més grans en pacients amb GB tractats mitjançant la TFD. Leroy et al., van descriure una sèrie de 251 pacients amb GB de novo i recurrents que van ser sotmesos a TFD intersticial amb 5-ALA. La mortalitat global va ser de l'1% i la morbiditat transitòria i persistent va ser del 5% en ambdós casos. No es va detectar cap dèficit neurològic permanent. La taxa de resposta tumoral després de la TFD va ser del 92%. En relació amb les dades d'evolució de la malaltia, la supervivència lliure de progressió va ser de 14,5 mesos per tumors diagnosticats de novo i de 14 mesos per tumors recurrents, mentre que la supervivència global va ser de 19 i 8 mesos respectivament. El 13% dels pacients inclosos en l'estudi es van considerar supervivents a llarg termini (> de 2 anys) després de la TFD (119).

També, Lietke et al., el mateix any van descriure els resultats obtinguts en 44 pacients avaluats de manera retrospectiva després de ser tractats amb TFD intersticial. L'estudi va incloure principalment GB. La mitjana de temps fins a la recurrència va ser de 7,1 mesos i la mitjana de supervivència lliure de progressió va ser de 13 mesos. Les taxes de supervivència lliure de progressió als 2 i 5 anys eren del 25 i 4,5%, respectivament. La resposta al tractament va ser heterogènia i no es va associar de manera significativa amb les característiques del pacient, factors relacionats amb el tractament o els marcadors moleculars tumorals (120).

L'any 2023, Folgar et al., van seleccionar 16 pacients amb GB supratentorial diagnosticats de novo, de mida petita i no tributaris a resecció quirúrgica. Aquests van ser sotmesos a la teràpia fotodinàmica intersticial (TFDi) amb 5-ALA com a tractament local inicial abans de la quimioirradiació estàndard. En comparar els resultats obtinguts amb una cohort retrospectiva de 110 pacients amb GB tractats amb el protocol estàndard (protocol STUPP), es va descriure com a tractament segur, factible i que podria estar associat amb una òptima supervivència lliure de progressió a llarg termini (121).

El mateix grup, posteriorment, va publicar un seguiment a llarg termini dels mateixos pacients. Van descriure que, principalment, els pacients amb metilació del MGMT van demostrar una progressió lliure de malaltia i una supervivència global significativament més llargues (121).

Finalment, també l'any 2023, Kozlikina et al., van descriure per primera vegada l'ús combinat del 5-ALA i la clorina e6 com a eines teranòstiques en un cas de GB recurrent amb resultats encoratjadors (122).

3. Justificació de la tesi doctoral

Tal com s'ha detallat prèviament, l'acumulació selectiva de 5-ALA i, en conseqüència, de PpIX a les cèl·lules glials tumorals, està generant un gran interès científic amb relació a l'ús d'aquest compost no només durant la resecció guiada per fluorescència sinó també com a fotosensibilitzador en la teràpia fotodinàmica.

Durant els últims anys s'han publicat múltiples estudis científics que tenien com a objectiu principal avaluar aquesta opció terapèutica, anant des de la seva viabilitat i eficàcia in vitro fins a l'aplicació clínica, especialment en pacients als qui no se'ls hi pot oferir cap altre tractament; ús compassiu.

Tot i els estudis publicats, existeix un buit de coneixement especialment en relació amb si s'ha estat aplicant de forma inadvertida la TFD amb 5-ALA durant la resecció quirúrgica guiada per fluorescència, així com l'eficàcia enfront diferents tipus de GIC, les quals són, tal com s'ha descrit amb detall prèviament, les principals responsables de la recidiva i resistència als tractaments estàndards.

Amb la finalitat d'aprofundir en el coneixement i l'aplicabilitat de la TFD mitjançant 5-ALA en el tractament del GB, el projecte de tesi doctoral que es desenvolupa a continuació es basarà en dues línies d'investigació de caràcter translacional.

Per una banda, es proposa avaluar la possibilitat d'haver estat aplicant teràpia fotodinàmica de forma inadvertida en aquells pacients als qui s'ha utilitzat la resecció guiada per fluorescència mitjançant 5-ALA com a adjuvant durant l'acte quirúrgic.

És ben conegut que les cèl·lules de GB poden infiltrar fins a 4 cm més enllà del marge tumoral, i que el model de recurrència més freqüent (75-90%) ocorre en forma de creixement continu des de la vora de la cavitat quirúrgica. A més, la llum blanca visible (amb una longitud d'ona d'entre els 380 als 700 nm) és capaç de penetrar fins a 1 centímetre de profunditat en el teixit cerebral, especialment aquella amb una longitud d'ona al voltant dels 600 nm, sobretot en situacions de baixa densitat cel·lular tumoral residual (en altres paraules, en els casos on s'ha aconseguit una resecció completa de l'àrea captant de contrast avaluat mitjançant RM).

Addicionalment, part de l'espectre lluminós capaç de penetrar el teixit cerebral es correspon al necessari per a l'activació de la PpIX, resultant en el seu efecte terapèutic. Tenint en compte les afirmacions esmentades, no és incoherent plantejar un estudi de caràcter retrospectiu, on s'avalui la hipòtesi d'una menor probabilitat de recurrència tumoral en el volum de parènquima comprès dins el primer centímetre des de la vora de la cavitat quirúrgica, en pacients afectats de GB als qui s'ha pogut obtenir una resecció completa (100% de la lesió captant de contrast valorat amb RM) guiada per fluorescència mitjançant 5-ALA.

Associat al treball que s'acaba de descriure, es proposa un estudi experimental de laboratori que servirà per valorar l'efecte de la TFD mitjançant 5-ALA sobre les GIC co-cultivades en forma de tumorsferes amb els nous models d'organoides cerebrals ("mini-brains"), prèviament desenvolupats pel nostre grup de treball.

Aquest, no només ens permetrà avaluar l'eficàcia preliminar de la TFD sobre les GIC, sinó que farà possible traslladar-la, amb un alt grau de fiabilitat, a la que es donaria en el pacient quan s'apliqui la TFD mitjançant el 5-ALA en condicions "in vivo".

Adicionalment, el co-cultiu amb els models d'organoides cerebrals ens permetrà avaluar dades preliminars de seguretat derivades de la selectivitat de la TFD per les cèl·lules tumorals respectant el parènquima sa, així com determinar quina és la dosi lumínica òptima per a l'obtenció de la màxima eficàcia en la TFD, sense induir un efecte fototèrmic que pugui ser lesiu pel parènquima circumdant.

HIPÒTESIS

1. L'ús de la resecció guiada per fluorescència mitjançant l'àcid 5-Aminolevulínic en el tractament del Glioblastoma, juntament amb el descobriment les capacitats del l'àcid 5-Aminolevulínic com a fotosensibilitzador ens permeten pensar que es podria haver estat aplicant la teràpia fotodinàmica de forma inadvertida. La nostra primera hipòtesi de treball és que podria existir una menor probabilitat de recurrència tumoral en el volum de parènquima comprès dins el primer centímetre des de la vora de la cavitat quirúrgica en els pacients afectats de Glioblastoma, als qui s'ha pogut obtenir una resecció completa (totalitat de la lesió captant de contrast valorat amb ressonància magnètica) guiada per fluorescència mitjançant l'àcid 5-Aminolevulínic.
2. L'ús de models de laboratori que ens permetin simular acuradament les implicacions esperables de la teràpia fotodinàmica en el moment de la seva aplicació als pacients, en termes d'eficàcia i seguretat, pot ser de gran utilitat per tal d'augmentar el grau de confiança a l'hora de plantejar un assaig clínic posterior. La nostra segona hipòtesi de treball és que els models de co-cultiu dels organoides cerebrals amb les "Glioma Initiating Cells" en forma de tumorsferes ens permetria avaluar l'eficàcia preliminar de la teràpia fotodinàmica mitjançant l'àcid 5-Aminolevulínic, l'obtenció de dades de seguretat preliminars relacionades amb la selectivitat del tractament sobre les cèl·lules tumorals i el coneixement de la dosi lumínica terapèutica òptima.

OBJECTIUS

1. Avaluar en una cohort retrospectiva de pacients si l'ús de la resecció guiada per fluorescència mitjançant l'àcid 5-Aminolevulínic en aquells afectats de Glioblastoma ha induït, de forma inadvertida, un efecte fotodinàmic terapèutic que es determinarà a través d'una menor probabilitat de recurrència tumoral dins el volum comprès fins al primer centímetre des de la cavitat quirúrgica en aquells pacients als qui s'ha aconseguit una resecció tumoral completa.
2. Simular les implicacions esperables de la teràpia fotodinàmica en el moment de la seva aplicació als pacients, en termes d'eficàcia i seguretat, a través de l'ús de models de laboratori basats en el co-cultiu d'organoides cerebrals amb tumorsferes de "Glioma Initiating Cells".
 - a. Determinar l'eficàcia preliminar de la teràpia fotodinàmica mitjançant l'àcid 5-Aminolevulínic sobre les "Glioma Initiating Cells".
 - b. Determinar la selectivitat de la teràpia fotodinàmica mitjançant l'àcid 5-Aminolevulínic sobre les "Glioma Initiating Cells", preservant les cèl·lules cerebrals sanes.
 - c. Conèixer la dosi lumínica òptima per l'obtenció del màxim dany sobre les cèl·lules neoplàsiques a través de la teràpia fotodinàmica mitjançant l'àcid 5-Aminolevulínic, sense induir lesió fototèrmica a les cèl·lules cerebrals sanes.

MATERIALS, MÈTODES I RESULTATS

1. “Photodynamic Therapy in glioblastoma: Detection of intraoperative inadvertent 5-ALA mediated photodynamic therapeutical effect after gross total resection” (Teràpia fotodinàmica en el glioblastoma: Detecció de l'efecte fotodinàmic terapèutic inadvertit amb 5-ALA després de la resecció completa)

El GB continua sent el tumor cerebral primari més freqüent i letal en adults, malgrat els avenços en les tècniques de resecció quirúrgica i la quimioteràpia i radioteràpia adjuvants. El patró de recurrència més freqüent (75-90%) es produeix en forma de creixement continu des del límit de la cavitat quirúrgica, destacant la necessitat de control tumoral locorregionals.

La resecció quirúrgica guiada per fluorescència amb 5-ALA s'ha implementat àmpliament en els protocols quirúrgics per a aquests tumors i en la literatura recent es destaca, també, l'aplicabilitat de la teràpia fotodinàmica mitjançant 5-ALA per tal d'obtenir un control tumoral locorregionals addicional.

Aquest estudi pretén, doncs, identificar si l'efecte terapèutic fotodinàmic amb 5-ALA després de la resecció completa ha tingut lloc de forma inadvertida a les cèl·lules tumorals localitzades a la perifèria de la cavitat quirúrgica, carregades amb protoporfirina IX i com a conseqüència de l'exposició a les fonts lumíniques del quiròfan.

En la metodologia, dels 146 pacients intervinguts per glioblastoma entre els anys 2015 i 2020, 33 van ser inclosos en aquest estudi. En tots ells es va aconseguir una resecció completa estricta (sense resecció supramarginal) i es va aplicar el protocol de quimioteràpia i radioteràpia adjuvant estàndard (protocol STUPP).

Es van crear dos grups de comparació en relació amb la ubicació de la recurrència (grup A: fins a un centímetre respecte a la cavitat quirúrgica, i grup B: més enllà d'un centímetre de la cavitat quirúrgica). El punt de tall es va determinar a un centímetre, ja que correspon a la penetració de la llum visible en el teixit cerebral normal.

Per l'obtenció dels resultats, es va dur a terme inicialment una anàlisi univariant i posteriorment es van confirmar amb una anàlisi multivariant. En l'anàlisi univariant, els dos grups de comparació únicament diferien amb relació a l'administració de 5-ALA, la qual estava significativament relacionada amb un menor risc relatiu de presentar la recurrència dins el primer centímetre de la cavitat quirúrgica (Risc Relatiu (RR)=0,655 (95% CI 0,442-0,970), valor de $p=0,046$). Tal com hem esmentat prèviament, aquest resultat es va corroborar en l'anàlisi multivariant (RR=0,730 (95% CI 0,340-0,980, valor de $p=0,017$).

Com a conclusió, en aquest estudi s'ha detectat l'efecte terapèutic fotodinàmic amb 5-ALA que ha tingut lloc de forma inadvertida en els pacients afectats de glioblastoma, als qui s'havia aconseguit una resecció tumoral completa i havien rebut el tractament adjuvant estàndard (protocol STUPP).



OPEN ACCESS

EDITED BY
Sergio García,
Hospital Universitario Río Hortega,
Spain

REVIEWED BY
David Aebischer,
University of Rzeszow, Poland
Nathan Simmons,
Dartmouth Hitchcock Medical Center,
United States

*CORRESPONDENCE
Abel Ferrés
abferres@clinic.cat

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Neuro-Oncology and
Neurosurgical Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

RECEIVED 26 October 2022
ACCEPTED 18 November 2022
PUBLISHED 02 December 2022

CITATION
Ferrés A, Di Somma A, Mosteiro A,
Topczewski TE, Roldán P, Pedrosa L,
Diao D, Pineda E, Sierra A, Enseñat J
and González-Sánchez JJ (2022)
Photodynamic therapy in
glioblastoma: Detection of
intraoperative inadvertent 5-ALA
mediated photodynamic therapeutic
effect after gross total resection,
Front. Oncol. 12:1080685.
doi: 10.3389/fonc.2022.1080685

COPYRIGHT
© 2022 Ferrés, Di Somma, Mosteiro,
Topczewski, Roldán, Pedrosa, Diao,
Pineda, Sierra, Enseñat and González-
Sánchez. This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Photodynamic therapy in glioblastoma: Detection of intraoperative inadvertent 5-ALA mediated photodynamic therapeutic effect after gross total resection

Abel Ferrés^{1*}, Alberto Di Somma^{1,2}, Alejandra Mosteiro¹,
Thomaz Eduardo Topczewski¹, Pedro Roldán^{1,2},
Leire Pedrosa³, Dioldé Diao³, Estela Pineda^{2,4}, Àngels Sierra⁵,
Joaquim Enseñat^{1,2} and José Juan González-Sánchez^{1,2}

¹Department of Neurosurgery, Clínic Institute of Neurosciences, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ³Department of Biomedicine, Faculty of Medicine, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona, Spain, ⁴Servicio de Oncología Médica, Clínic Institute of Hematological and Oncological Diseases, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵Department of Medicine and Life Sciences, Facultad de Ciencias de la Salud y de la Vida, Universidad Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Introduction: Glioblastoma (GBM) remains the most frequent and lethal primary brain tumor in adults, despite advancements in surgical resection techniques and adjuvant chemo- and radiotherapy. The most frequent recurrence pattern (75–90%) occurs in the form of continuous growth from the border of the surgical cavity, thus emphasizing the need for locoregional tumor control. Fluorescence-guided surgical resection using 5-ALA has been widely implemented in surgical protocols for such tumors. Recent literature also highlights the applicability of 5-ALA-mediated photodynamic therapy to obtain locoregional tumor control further. This study aims to identify if 5-ALA mediated photodynamic therapeutic effect after gross total glioblastoma resection has inadvertently occurred due to the exposition of protoporphyrin IX charged peripheral tumoral cells to operative room light sources.

Methods: Of 146 patients who were intervened from glioblastoma between 2015 and 2020, 33 were included in the present study. Strict gross total resection (without supralocal resection) had been accomplished, and adjuvant chemoradiotherapy protocol was administered. Two comparison groups were created regarding the location of the recurrence (group A: up to 1 centimeter from the surgical cavity, and group B: beyond 1 centimeter from the surgical cavity). The cutoff point was determined to be 1 centimeter because of the visible light penetrance to the normal brain tissue.

Results: In univariate analysis, both groups only differed regarding 5-ALA administration, which was significantly related to a minor relative risk of presenting the recurrence within the first centimeter from the surgical cavity (**Relative Risk = 0,655 (95% CI 0,442-0,970), p-value=0,046**). Results obtained in univariate analysis were corroborated posteriorly in multivariate analysis (**RR=0,730 (95% CI 0,340-0,980), p=0,017**).

Discussion: In the present study, a probable inadvertent 5-ALA photodynamic therapeutical effect has been detected *in vivo*. This finding widely opens the door for further research on this promising theragnostic tool.

KEYWORDS

photodynamic therapy, 5-aminolevulinic acid, glioblastoma, neurosurgical oncology, locoregional adjuvant therapy

Introduction

Glioblastoma (GBM) (1) remains the most frequent (incidence of about 4-5 cases per 100000 inhabitants per year) and lethal (median overall survival time of 15 months) primary brain tumor in adults (2), despite the best surgical resection techniques and adjuvant chemo-radiotherapy (3, 4). Its highly infiltrating nature and tendency to recurrence primarily limits locoregional disease control and impedes cure, thus resulting in low survival rates (5, 6). Therefore, there is a need to identify and develop new treatments to increase locoregional disease control following surgical resection.

In this direction, locoregional photodynamic therapy has been progressively studied, especially *in vitro*. It has shown promising results in selective tumoral cell death, thus sparing normal brain parenchyma (7–14). Photodynamic therapy (PhT) is a two-step treatment that involves the administration of a photosensitizer agent (5-aminolevulinic acid; 5-ALA), which produces intracellular Protoporphyrin IX (PPIX) accumulation. PPIX is a fluorophore metabolite whose activation at a specific light wavelength (600-800 nm) generates oxidative stress and consequent cell death (10, 15–17).

It is well known that GBM cells can be found up to 4 centimeters beyond the border of radiologically or histologically identifiable tumor (18), and the most frequent recurrence pattern (75–90%) occurs in the form of continuous growth from the border of the surgical cavity (19–23). In association, visible white light (380–700 nm) penetrance in cerebral tissue may reach 1-centimeter depth (especially at 600 nm and favored in cases of low residual cell density in the surgical field (24)), and part of its spectrum is superposed for PPIX activation (25–28) resulting in its therapeutic effect.

Based on the previous statements, a minor recurrence rate within the first centimeter from the surgical cavity border may

be hypothesized in patients affected by GBM after gross total resection (100% of the contrast-enhancing lesion) when 5-ALA has been administrated in conjunction with visible light exposure to the surgical field during the surgery.

The present study aims to determine if locoregional photodynamic therapy has been inadvertently produced *in vivo*, thus encouraging further investigation in humans.

Materials and methods

Study population

The central nervous system (CNS) tumor database of the Hospital Clínic de Barcelona, Spain, was queried to identify all patients treated for glioblastoma between 2015 and 2020. A total of 146 patients were initially identified. Patients finally included in the present study were those whose gross total resection of the contrast-enhancing lesion was achieved, resulting in 33 individuals. Supratotal resection (contrast-enhancing lesion plus 100% of hyperintense area in T2-weighted FLAIR) was not obtained. Variables included in the study were demographic characteristics, initial symptoms, initial functional status, tumor location, preoperative tumor volumetry, tumor superficiality classification (29), leptomeningeal dissemination, ependymal disease, 5-aminolevulinic acid administration (5-ALA), intraoperative adjuvants (neurophysiologic monitoring and intraoperative magnetic resonance imaging (MRI), surgical time, light exposure time, supratotal resection, adjuvant treatment (chemotherapy and radiotherapy protocols), location of the recurrence with respect to the surgical field (up to 1 cm vs. beyond 1 cm), and complications. Two comparison groups were created according to the location of the recurrence (Group A: up

to 1 cm from the surgical field, and Group B: beyond 1 cm from the surgical field). Differences between groups have been initially evaluated through univariate analysis, focusing on differences regarding 5-ALA administration. After that, the differences encountered were corroborated using multivariate analysis. This study involving human participants was reviewed and approved by Barcelona's Clinic hospital ethical board. According to legislation, participant informed consent was not necessary to be obtained because of the study's retrospective nature, anonymized recorded clinical data, and the impossibility of identifying participants directly or through identifiers in study results.

Location of the recurrence

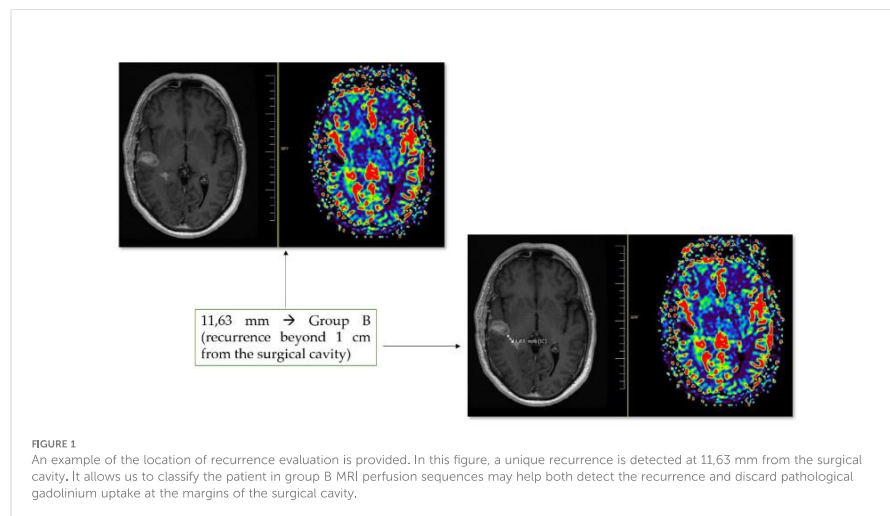
The study's principal objective was to evaluate if there are differences regarding the location of the recurrence concerning the surgical field in patients whose 5-ALA was administrated versus patients whose 5-ALA was not administrated and if an unnoticed photodynamic therapeutical effect could explain these differences after controlling for possible confounding variables.

The initial and residual tumors were measured onto volumetric MRI acquired through a 1.5 T scanner (Siemens) within the first 48 hours from the surgery, through a semiautomatic region of interest (ROI) analysis with Iplan cranial v.3.0 software (Brainlab®, Feldkirchen, Germany). T1-weighted gadolinium-enhanced and T2-weighted FLAIR sequences were used to define preoperative enhancing tumor volume and infiltrative volume outside the enhanced areas, respectively. Residual tumor volume was

measured in postoperative MRI performed up to 48 hours from the surgery and co-registered with the preoperative dataset. Only patients presenting gross total resection of the contrast-enhancing lesion were included. A variable amount of infiltrating non-contrast enhancing tumor (hyperintense in T2-weighted FLAIR sequence) may have been resected. Still, in any of the included participants, FLAIR area resection reached 100%, thus not considered supratotal resection. For these patients, the follow-up MRI when recurrence after first-line treatment was detected was posteriorly evaluated. Radiologic tumor recurrence was defined according to the response assessment in neuro-oncology (RANO-HGG) 2010 criteria (30). The location of the recurrence from the surgical field was calculated using the nearest distance between the previous surgical field to the recurrent lesion (if solitaire) or the nearer recurrent lesion (if multiple) using the ruler tool of the radiological imaging software RAIM server DICOM viewer® (UDIAT S.A., Sabadell, Barcelona). Patients were then categorized into the two groups previously described in the study population. An example is provided in Figure 1.

Light exposure time

The retrospective nature of this study focused on evaluating a possible inadvertent 5-ALA photodynamic therapeutic effect in patients affected by GBM impeded a protocolized light delivery to the surgical field in terms of homogenous distribution, intensity, and time duration. Thus, the light was progressively delivered to the surgical cavity during tumor resection and



hemostasis. In our study and being aware of this previously mentioned heterogeneity in light delivery, we considered light exposure time as the result of the duration between corticotomy and dural closure. This information was retrospectively obtained from surgical and anesthesia reports.

Statistical analysis

Descriptive analysis was realized for both comparison groups. Continuous variables were described using median and range, and categorical variables were defined using absolute and relative frequencies. Comparative analysis was realized after that. For univariate analysis, differences between groups for continuous variables were evaluated using the Mann-Whitney U test and presented with the p-value. Differences between groups for categorical variables were assessed using the Chi-square test and given *via* relative risk (RR) and p-value. Multivariate analysis was calculated using logistic regression, and differences were presented with the p-value and RR.

Results

Thirty-three patients from 146 initially identified to be treated for glioblastoma were finally included in the statistical analysis. Gross total resection (without supratotal resection) was achieved, and complete adjuvant therapy (chemo- and radiotherapy) was administered, thus homogenizing the sample.

The median age was 63,5 and 63 years for groups A and B, respectively, with male predominance in group A (11; 61,1%) and slight female predominance in group B (8; 53,3%). Initial symptoms were more frequent behavioral changes in group A and seizures in group B, without significant differences in initial functional status (median Karnofsky Performance Scale (KPS) of 95 and 90 for each group, respectively). Tumors were more frequently located in the temporal lobe (9; 50%) in group A and frontal (5; 33,3%) and parietal (4; 26,3%) lobes in group B, principally cortical positioned in both groups, without significant differences. Median preoperative volumetry was slightly different between groups: 25,43cc for group A and 30,64cc for group B, without reaching statistical significance. In most cases, neither leptomeningeal dissemination nor ependymal disease was detected. For group B, intraoperative MRI and neuromonitoring were more frequently needed as intraoperative adjuvants without reaching statistical significance. No significant differences were related to the tumor's molecular characteristics (MGMT, IDH, ATRX, EGFR, TP53, and Ki67). All patients received adjuvant chemo- and radiotherapy without significant differences in the treatment protocol. Regarding chemotherapy, temozolomide was the first choice in both groups (94,4% and 100% for groups A and B, respectively). Regarding radiotherapy, hyperfractionated protocol was also the first option in both groups (90,4% and 86,7% for groups A and B, respectively). After treatment of the tumor, no significant differences were found between groups regarding hospital length of stay, complications, and functional status. Group's characteristics are summarized in Table 1.

TABLE 1 Basal characteristics.

Variable		Group A (n=18)	Group B (n=15)	p-value
Age		63,5 (41-87)	63 (49-88)	0,2
Sex	Male	11 (61,1%)	7 (46,7%)	0,494
	Female	7 (38,9%)	8 (53,3%)	
Initial symptoms	Headache	1 (5,6%)	3 (20%)	0,153
	Seizure	2 (11,1%)	4 (26,7%)	
	Hemiparesis/hemiplegia	2 (11,1%)	3 (20%)	
	Behavioral changes	9 (50%)	3 (20%)	
	Hemihypoesthesia/anesthesia	2 (11,1%)	0	
	Aphasia	0	1 (6,7%)	
	Facial paralysis	0	1 (6,7%)	
	Mutism	2 (11,1%)	0	
Initial KPS		95 (80-100)	90 (70-100)	0,539
Tumor location	Frontal	2 (11,1%)	5 (33,3%)	0,223
	Temporal	9 (50%)	2 (13,3%)	
	Parietal	5 (27,8%)	4 (26,3%)	
	Occipital	1 (5,6%)	2 (13,3%)	
	Frontoparietal	0	1 (6,7%)	
	Parietooccipital	1 (5,6%)	1 (6,7%)	

(Continued)

TABLE 1 Continued

Variable			Group A (n=18)	Group B (n=15)	p-value
Superficiality	Subventricular zone		0	0	0,641
	Cortex		14 (77,8%)	12 (80%)	
	Subventricular zone and cortex		3 (16,7%)	3 (30%)	
	None (white substance)		1 (5,6%)	0	
Preoperative tumor volumetry			25,43cc (15,65-45,86)	30,64 (20,79-47,76)	0,776
Leptomeningeal dissemination	Yes		2 (11,1%)	2 (13,3%)	0,622
	No		15 (83,3%)	12 (80%)	
Ependymal disease	Yes		0	1 (6,7%)	0,437
	No		18 (100%)	13 (86,7%)	
5-ALA (5-aminolevulinic acid)	Yes		11 (61,1%)	14 (93,3%)	0,046
	No		7 (38,9%)	1 (6,7%)	
Light exposure time (min)			135 (15-207)	84 (27-252)	0,166
Intraoperative adjuvants	iMRI		3 (16,7%)	8 (53,3%)	0,223
	Neuromonitoring		0	4 (26,7%)	
	Awake		2 (11,1%)	0	
MGMT	Methylated		10 (55,6%)	11 (73,3%)	0,704
	No methylated		6 (33,3%)	4 (26,7%)	
IDH	Mutated		0	0	0,255
	Wild type		18 (100%)	15 (100%)	
ATRX	ATRX +		0	1 (6,7%)	1
	ATRX -		4 (22,2%)	8 (53,3%)	
TP53	Mutated		5 (27,8%)	8 (53,3%)	0,238
	No mutated		9 (50%)	4 (26,7%)	
EGFR	Mutated		5 (27,8%)	10 (66,7%)	0,262
	Wild type		3 (16,7%)	1 (6,7%)	
Ki67			30% (20-70%)	25% (5-40%)	0,112
			17 (94,4%)	15 (100%)	
Chemotherapy	Temozolomide		17 (94,4%)	15 (100%)	0,232
	Bevacizumab		1 (5,6%)	0	
Radiotherapy	Hyperfractionated		17 (90,4%)	13 (86,7%)	0,193
	WBRT		1 (5,6%)	0	
	Hypofractionated		0	2 (13,3%)	
Postoperative complications	Immediate (first 24 hours)	Hematoma	1 (5,6%)	0	0,209
	Early (from first 24h up to 6th month)	Subacute hydrocephalus	0	1 (6,7%)	
		Surgical wound infection	0	1 (6,7%)	
		Hematoma	1 (5,6%)	0	
	Late (beyond 6th month)	Hydrocephalus	1 (5,6%)	1 (6,7%)	
Hospital length of stay			6 (4-21)	6,5 (3-25)	0,543
Early KPS (up to 6th month)			90 (50-100)	90 (70-100)	0,654
Late KPS (after 6th month)			80 (50-100)	70 (40-90)	0,235

Statistically significative values in bold.

When evaluating the relation between 5-ALA administration and the location of the recurrence, significant differences were found in the univariate analysis. 5-ALA administration was significantly related to a minor relative risk of presenting the recurrence within the first centimeter from the surgical cavity (0,655 95% CI 0,442-0,970; $p=0,046$) (Table 2). Afterward, the authors analyzed if light exposure time may be related to the location of the recurrence for the 5-ALA

subgroup, and no significant differences were found ($p=0,166$) (Table 3).

The relation initially found between 5-ALA administration and minor relative risk to present the recurrence within the first centimeter from the surgical field was posteriorly evaluated in conjunction with other possible confounding variables in the multivariate analysis. Items included in the statistical analysis, different from 5-ALA administration, were superficiality

TABLE 2 Univariate analysis.

Variable		5-ALA		RELATIVE RISK	p-Value
		Yes	No		
Recurrence location	Recurrence up to 1 cm from the surgical cavity	11 (61,1%)	7 (38,9%)	0,655 (0,442-0,970)	0,046
	Recurrence beyond 1 cm from surgical cavity	14 (93,3%)	1 (6,7%)	5,833 (0,805-42,253)	

Evaluation of the relationship between 5-ALA exposure and recurrence location.
Statistically significant values in bold.

classification, radiotherapy protocol administered, chemotherapy protocol administered, ependymal disease, leptomeningeal dissemination, and light exposure time. Again, only the relation between 5-ALA administration and negligible risk for the location of the recurrence up to the first centimeter from the surgical cavity reached statistical significance (0,730 95% CI 0,340-0,980; $p=0,017$) (Table 4).

Discussion

Because the most frequent recurrence pattern in patients affected by HGG occurs in the form of continuous growth from the border of the surgical cavity, 5-ALA metabolites (protoporphyrin IX) can be activated at the visible light wavelength (380-700 nm), and its penetrance in cerebral tissue may reach up to 1 cm depth, the apparent 5-ALA photodynamic therapeutical effect may have been inadvertently produced on operated patients affected from glioblastoma when 5-ALA has been administered preoperatively, and tumoral intracellular protoporphyrin IX intraoperatively activated through operative room light sources. The present study aimed to analyze if this hypothesized 5-ALA photodynamic effect has been inadvertently produced in a cohort of patients affected by glioblastoma.

Considering the previously exposed statements, the authors hypothesized that the recurrence of patients with 5-ALA that was administrated preoperatively would be less probable located within the first centimeter from the surgical cavity. To accurately evaluate this hypothesis, confusion control is of utmost importance. Restrictive inclusion criteria, group comparativeness evaluation, and multivariate analysis were used. Our results have shown that recurrences were

significantly less frequent within the first centimeter from the surgical cavity in the 5-ALA group, thus increasing the possibility of having detected an inadvertent *in vivo* 5-ALA photodynamic therapeutical effect in patients affected by GBM IDH wild-type. The presented results may have been facilitated, at least partially, due to the superficial location (cortical) of the tumors in most of the individuals included in the study. This location eases light exposure in the hole surgical cavity and promotes photodynamic reactions in patients in the 5-ALA group.

In addition to the principal analysis, differences regarding the location of the recurrence were evaluated concerning light exposure times only for the subgroup of patients whose 5-ALA was administered preoperatively. Paradoxically to what we would expect, the median light exposure time was minor in patients whose 5-ALA was administered and recurrence located beyond 1 cm from the surgical field, without reaching statistical significance. It is described in the literature that the dose of light delivered is essential to obtain maximum photobleaching of photosensitizer, thus resulting in optimal effectivity of the therapy. Advanced photobleaching is the fluence rate that causes more than 95% photobleaching of photosensitizer and is related to better results. For 5-ALA photodynamic therapy, advanced photobleaching is achieved at 4 mm from the surface of a light diffuser emitting power of 200 mW/cm for 1 hour (31–34). In the present study, median light exposure time surpasses 60 minutes in both groups; nevertheless, the power of the light

TABLE 4 Multivariate analysis.

Variable	Recurrence location (up to 1 cm from surgical cavity vs. Beyond 1 cm)
5-ALA	0,017 (RR=0,540; 95% CI 0,453-0,872) (a)
Superficiality classification	0,299
Radiotherapy protocol	0,107
Chemotherapy protocol	0,283
Ependymal disease	0,169
Leptomeningeal dissemination	0,332

(a) relation between recurrence location beyond 1 cm from the surgical cavity and 5-ALA administration.
Statistically significant values in bold.

TABLE 3 Univariate analysis.

Variable		Light exposure time (median)	p-Value
Recurrence location	Up to 1 cm from the surgical cavity	136	0,166
	Beyond 1 cm from the surgical cavity	81	

Evaluation of the relationship between light exposure time and recurrence location in the 5-ALA group.

source and surgical field exposure may not be constant and/or homogeneous between groups or individuals in the same group. Uncontrolled differences in reaching advanced photobleaching of the photosensitizer between groups may explain, at least partially, the paradoxical trend in results obtained.

In the literature, few studies have reported their preliminary experience with 5-ALA photodynamic therapy in patients affected by high-grade gliomas. Regarding its efficacy as a surgical adjuvant, one group combined fluorescence-guided surgery (FGS) and postoperative photodynamic therapy; 5-ALA photodynamic therapy was performed with an implanted catheter in patients with primary GBM on the day of FGS. Photodynamic therapy was then realized at 24-hour intervals for five sessions, and the results were compared with the control group (conventional surgical resection). Delayed mean tumor progression (8.6 vs. 4.8 months) and increased mean survival (52.8 vs. 24.6 weeks) were observed in the group that received both FGS and photodynamic therapy when compared with the control group (35). Another group combined 5-ALA FGS in patients affected by recurrent GBM and intracavitary 5-ALA photodynamic therapy through laser diffusers strategically positioned inside the resection cavity. They reported median progression-free survival of 6 months without an increase in surgical morbidity and postoperative complications (36). Regarding its efficacy as a sole rescue treatment for GBM recurrences, two groups report their experience. One of them evaluated the efficacy of this therapy in 10 patients affected by small (maximum diameter < 3 cm) circumscribed recurrent malignant gliomas. The 1-year survival rate was 60%, with a median survival of 15 months. The other group also evaluated the efficacy of this therapy in 15 patients affected by small newly diagnosed (maximum diameter < 4 cm). It was compared to GBM patients who underwent tumor resection alone. The interstitial photodynamic therapy group demonstrated a significantly longer median progression-free survival of 16 vs. 10.2 months and a 3-years survival of 56 vs. 21% (33, 37).

The two most extensive clinical studies have been recently published: On the one hand, Leroy et al., in 2021, described a series of 251 patients who underwent interstitial 5-ALA photodynamic therapy. Overall mortality was 1%, and transient and persistent morbidity was 5%. Tumor response after photodynamic therapy was 92%, progression-free survival was 14.5 months for *de novo* lesions and 14 months for recurrent ones, respectively, and overall survival was 19 months and eight months for the same groups, respectively (38). On the other hand, Lietke et al., in 2021, described 44 retrospectively evaluated patients after being also treated with interstitial photodynamic therapy. The median time to failure was 7.1 months, and the median progression-free survival was 13 months (39).

Although the publications are increasing on such attractive novel therapy, more studies are needed to further evaluate the efficacy, effectiveness, and safety of the 5-ALA photodynamic therapy for treating patients affected by GBM. The authors

consider that the previously presented literature, in conjunction with the results mentioned in the present study, may justify efforts to investigate such a promising adjuvant and/or rescue therapy for the treatment of GBM. Our efforts have been primarily oriented toward evaluating its intraoperative efficacy because a lack of publications is evident in this specific treatment modality. In this direction, recently published preliminary results of the INDYGO trial postulated that 5-ALA photodynamic therapy delivered immediately after resection as adjuvant therapy for GBM is safe and may help to decrease the recurrence risk by targeting residual tumor cells in the resection cavity (40).

Study limitations

Although necessary to provide the most reliable results, restrictive inclusion criteria limit its generalization. In addition, the study's retrospective nature carries inherent bias despite efforts to control it as much as possible. Also, as mentioned previously in the methodology section, heterogeneity regarding light exposure time must be considered when analyzing related results. Nevertheless, despite this heterogenic light exposure, recurrence was less frequent within the first centimeter from the surgical cavity when 5-ALA was administered, and gross total resection was accomplished. Finally, although supramarginal resections have been excluded, smaller tumors located in non-eloquent areas may allow for a more aggressive resection, thus resulting in partial excision of the surrounding tissue. In the present study, achieving more significant resection of the peritumoral brain parenchyma may overestimate the photodynamic therapy's effect due to the smaller amount of pathologic tissue (hyperintense in MRI FLAIR sequence) surrounding the surgical cavity.

Conclusion

A possible inadvertent 5-ALA photodynamic therapeutic effect may have been detected in patients affected by GBM after gross total resection. These results, in conjunction with favorable data published in the literature and previously presented in the present study, encourage further investigation of this promising therapy as a surgical add-on after primary GBM resection or recurrence or as a sole rescue treatment in non-resectable or recurrent cases of this primary brain cancer.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

This study involving human participants was reviewed and Photodynamic therapy in glioblastoma approved by Barcelona's Clinic hospital ethical board. According to legislation, participant informed consent was not necessary to be obtained because of the study's retrospective nature, anonymized recorded clinical data, and the impossibility of identifying participants directly or through identifiers in study results.

Author contributions

AF and JG-S designed and led the present study. AF and AM developed the theory and performed the computations. AF and AM collected the clinical and economic data. AF, AM, AD, TT, PR, LP, DD, AS, and JG-S performed the analytical methods and interpreted them. AF drafted the manuscript. JG-S, AD, PR, AS, and JE critically revised the manuscript. JE gave institutional,

material, and logistic support. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol* (2021) 23(8):1231–51. doi: 10.1093/neuonc/noab106
- Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2014) 23(10):1985–96. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* (2009) 10(5):459–66. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* (2005) 352(10):987–96. doi: 10.1056/NEJMoa043330
- Sahm F, Capper D, Jeibmann A, Habel A, Paulus W, Troost D, et al. Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. *Arch Neurol* (2012) 69(4):523–6. doi: 10.1001/archneurol.2011.2910
- Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* (2007) 114(5):443–58. doi: 10.1007/s00401-007-0293-7
- Tetard MC, Vermandel M, Leroy HA, Leroux B, Maura CA, Lejeune JP, et al. Interstitial 5-ALA photodynamic therapy and glioblastoma: Preclinical model development and preliminary results. *Photodiagnosis Photodyn Ther* (2016) 13:218–24. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.07.169
- Hirschberg H, Sørensen DR, Angell-Petersen E, Peng Q, Tromberg B, Sun CH, et al. Repetitive photodynamic therapy of malignant brain tumors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* (2006) 25(1–2):261–79. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v25i1-2.170
- Olowzy B, Hundt CS, Stocker S, Bise K, Reulen HJ, Stummer W. Photoradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid. *J Neurosurg* (2002) 97(4):970–6. doi: 10.3171/jns.2002.97.4.970
- Hirschberg H, Berg K, Peng Q. Photodynamic therapy mediated immune therapy of brain tumors. *Neuroimmunol Neuroinflamm* (2018) 5(7):27. doi: 10.20517/2347-8659.2018.31
- Busch TM, Xing X, Yu G, Yodh A, Wileyto EP, Wang HW, et al. Fluence rate-dependent intratumor heterogeneity in physiologic and cytotoxic responses to photofrin photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* (2009) 8(12):1683–93. doi: 10.1039/b9pp00004f
- Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, Hirschberg H. Development of a novel indwelling balloon applicator for optimizing light delivery in photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* (2001) 29(5):406–12. doi: 10.1002/lsm.10005
- Tsai J-C, Hsiao Y-Y, Teng L-J, Chen C-T, Kao M-C. Comparative study on the ALA photodynamic effects of human glioma and meningioma cells. *Lasers Surg Med* (1999) 24(4):296–305. doi: 10.1002/(sici)1096-9101(1999)24:4<296::aid-lsm7>3.0.co;2-f
- Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempski O, et al. *In vitro* and *in vivo* porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* (1998) 45(2–3):160–9. doi: 10.1016/S1011-1344(98)00176-6
- Ewelt C, Nemes A, Senner V, Wölfer J, Brokinkel B, Stummer W, et al. Fluorescence in neurosurgery: Its diagnostic and therapeutic use. review of the literature. *J Photochem Photobiol B* (2015) 148:302–9. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.05.002
- Mahmoudi K, Garvey KL, Bouras A, Cramer G, Stepp H, Jesu Raj JG, et al. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *J Neurooncol* (2019) 141(3):595–607. doi: 10.1007/s11060-019-03103-4
- Kaneko S, Fujimoto S, Yamaguchi H, Yamauchi T, Yoshimoto T, Tokuda K. Photodynamic therapy of malignant gliomas. *Prog Neurol Surg* (2018) 32:1–13. doi: 10.1159/000469675
- Silbergeld DL, Chicoine MR. Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain. *J Neurosurg* (1997) 86(3):525–31. doi: 10.3171/jns.1997.86.3.0525
- Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, Herbolt K, Gebarski SS, Martel MK, et al. Patterns of failure following high-dose 3-d conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1999) 43(1):79–88. doi: 10.1016/S0360-3016(98)00266-1
- Loeffler J, Alexander E, Hochberg FH, Wen PY, Morris JH, Schoene WC, et al. Clinical patterns of failure following stereotactic interstitial irradiation for malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1990) 19(6):1455–62. doi: 10.1016/0360-3016(90)90358-Q
- Halperin EC, Burger PC, Bullard DE. The fallacy of the localized supratentorial malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1988) 15(2):505–9. doi: 10.1016/S0360-3016(98)90036-0
- Gaspar LE, Fisher BJ, Macdonald DR, Leber DV, Halperin EC, Schold SC, et al. Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1992) 24(1):55–7. doi: 10.1016/0360-3016(92)91021-E
- Petrecella K, Guiot MC, Panet-Raymond V, Souhami L. Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma. *J Neurooncol* (2013) 111(1):19–23. doi: 10.1007/s11060-012-0983-4

24. Genina EA, Genina EA, Bashkatov AN, Bashkatov AN, Tuchina DK, Tuchina DK, et al. Optical properties of brain tissues at the different stages of glioma development in rats: pilot study. *BioMed Opt Express* (2019) 10(10):5182–97. doi: 10.1364/BOE.10.005182
25. Quirk BJ, Brandal G, Donlon S, Vera JC, Mang TS, Foy AB, et al. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors—where do we stand? *Photodiagnosis Photodyn Ther* (2015) 12(3):530–44. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.04.009
26. Wang H-W, Zhu TC, Putt ME, Solonenko M, Metz J, Dimofte A, et al. Broadband reflectance measurements of light penetration, blood oxygenation, hemoglobin concentration, and drug concentration in human intraperitoneal tissues before and after photodynamic therapy. *J BioMed Opt* (2005) 10(1):014004. doi: 10.1117/1.1854679
27. Stables GL, Ash DV. Photodynamic therapy. *Cancer Treat Rev* (1995) 21(4):311–23. doi: 10.1016/0305-7372(95)90035-7
28. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* (2009) 24(2):259–68. doi: 10.1007/s10103-008-0539-1
29. Lim DA, Cha S, Mayo MC, Chen MH, Keles E, Vandenberg S, et al. Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. *Neuro Oncol* (2007) 9(4):424–9. doi: 10.1215/15228517-2007-023
30. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol* (2010) 28(11):1963–72. doi: 10.1200/JCO.2009.26.3541
31. Johansson A, Faber F, Kniebühler G, Stepp H, Sroka R, Egersperger R, et al. Protoporphyrin IX fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis. *Lasers Surg Med* (2013) 45(4):225–34. doi: 10.1002/lsm.22126
32. Johansson A, Palte G, Schnell O, Tonn JC, Herms J, Stepp H. 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors. *Photochem Photobiol* (2010) 86(6):1373–8. doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00799.x
33. Beck TJ, Kreth FW, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Stepp H, et al. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg Med* (2007) 39(5):386–93. doi: 10.1002/lsm.20507
34. Stepp H, Stummer W. 5-ALA in the management of malignant glioma. *Lasers Surg Med* (2018) 50(5):399–419. doi: 10.1002/lsm.22933
35. Eljamel MS, Goodman C, Moseley H. ALA and photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre phase III randomised controlled trial. *Lasers Med Sci* (2008) 23(4):361–7. doi: 10.1007/s10103-007-0494-2
36. Schipmann S, Muther M, Stögbauer L, Zimmer S, Brokinkel B, Holling M, et al. Combination of ALA-induced fluorescence-guided resection and intraoperative open photodynamic therapy for recurrent glioblastoma: case series on a promising dual strategy for local tumor control. *J Neurosurg* (2020) 134(2):426–36. doi: 10.3171/2019.11.JNS192443
37. Schwartz C, Rühm A, Tonn J-C, Kreth S, Kreth F-W. SURG-25 INTERSTITIAL PHOTODYNAMIC THERAPY OF DE-NOVO GLIOBLASTOMA MULTIFORME WHO IV. *Neuro Oncol* (2015) 17(Suppl 5):v219. doi: 10.1093/neuonc/nov235.25
38. Leroy HA, Guérin L, Lecomte F, Baert G, Vignion AS, Mordon S, et al. Is interstitial photodynamic therapy for brain tumors ready for clinical practice? a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* (2021) 36:102492. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102492
39. Lietke S, Schmutz M, Schwartz C, Weller J, Siller S, Aumiller M, et al. Interstitial photodynamic therapy using 5-ALA for malignant glioma recurrences. *Cancers (Basel)* (2021) 13(8):1767. doi: 10.3390/cancers13081767
40. Vermandel M, Dupont C, Lecomte F, Leroy HA, Tulesca C, Mordon S, et al. Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma patients: a preliminary analysis of the INDYGO clinical trial. *J Neurooncol* (2021) 152(3):501–14. doi: 10.1007/s11060-021-03718-6

2. “Preclinical Studies with Glioblastoma Brain Organoid Co-Cultures Show Efficient 5-ALA Photodynamic Therapy” (Estudis preclínic amb co-cultius d’organoides cerebrals de glioblastoma demostren l’eficàcia de la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA)

L’alta recurrència del glioblastoma, a partir de les cèl·lules romanents adjacents a la cavitat de resecció, dins els primers dos anys de diagnòstic, insta a millorar les teràpies orientades al control local i regional del GB.

La teràpia fotodinàmica s’ha proposat com a opció terapèutica per tal d’eliminar les cèl·lules tumorals infiltrants en el parènquima i així limitar la progressió tumoral a curt i mitjà termini així com millorar la supervivència.

Aquest article es proposa examinar els efectes de la TFD mitjançant 5-ALA així com determinar les condicions òptimes per tal d’aconseguir la major eficàcia terapèutica sense causar lesions fototòxiques en el teixit cerebral normal.

Metodològicament, es va utilitzar una plataforma amb dues estirps de GIC (GIC7 i PG88; estirps proneural i mesenquimal respectivament) que infiltraven organoides cerebrals. Es va mesurar la captació de 5-ALA per part de les GIC, l’activitat de la TFD amb 5-ALA mitjançant corbes de dosi-resposta i l’eficàcia i selectivitat del tractament mesurant l’activitat proliferativa i l’apoptosi.

Com a resultats, es va evidenciar que en aplicar 5-ALA (50 i 100 µg/mL), les mesures de fluorescència de la protoporfirina IX augmenten de forma progressiva fins a estabilitzar-se a les 24 hores. A més, es va detectar la disminució de la proliferació cel·lular així com un augment en l’apoptosi de les cèl·lules canceroses sense alterar les cèl·lules cerebrals normals, confirmant l’eficàcia i selectivitat de la TFD amb 5-ALA.

Com a conclusions, aquest estudi proporciona evidència sobre l’eficàcia de la TFD amb 5-ALA per tractar cèl·lules de GB altament proliferatives en un sistema in vitro complex, el qual combina cèl·lules cerebrals normals i tumorals.

Article

Preclinical Studies with Glioblastoma Brain Organoid Co-Cultures Show Efficient 5-ALA Photodynamic Therapy

Leire Pedrosa ^{1,†}, Carmen Bedia ^{2,†}, Diouldé Diao ¹, Alejandra Mosteiro ³, Abel Ferrés ³, Elisabetta Stanzani ⁴, Fina Martínez-Soler ⁵, Avelina Tortosa ⁵, Estela Pineda ⁶, Iban Aldecoa ^{7,8}, Marc Centellas ⁹, Marta Muñoz-Tudurí ⁹, Ana Sevilla ^{10,11,*}, Àngels Sierra ^{1,12,*} and José Juan González Sánchez ^{1,3}

- ¹ Laboratory of Experimental Oncological Neurosurgery, Neurosurgery Service, Hospital Clinic de Barcelona—FCRB, 08036 Barcelona, Spain
 - ² Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), 08034 Barcelona, Spain
 - ³ Department of Neurosurgery, Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
 - ⁴ Laboratory of Pharmacology and Brain Pathology, IRCCS Humanitas Research Hospital, 20089 Milan, Italy
 - ⁵ Apoptosis and Cancer Unit, Department of Basic Nursing, IDIBELL, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, 08907 L'Hospitalet del Llobregat, Spain
 - ⁶ Medical Oncology Department, Hospital Clinic and Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors, IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain
 - ⁷ Department of Pathology, Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
 - ⁸ Neurological Tissue Bank of the Biobank, Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain
 - ⁹ Laboratorios Gebro Pharma S.A., 08022 Barcelona, Spain
 - ¹⁰ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
 - ¹¹ Institute of Biomedicine, University of Barcelona (IBUB), 08036 Barcelona, Spain
 - ¹² Department of Medicine and Life Sciences (MELIS), Faculty of Health and Live Sciences, Universitat Pompeu Fabra, 08036 Barcelona, Spain
- * Correspondence: anasevilla@ub.edu (A.S.); masierra@clinic.cat (À.S.)
† These authors have contributed equally to this work.



Citation: Pedrosa, L.; Bedia, C.; Diao, D.; Mosteiro, A.; Ferrés, A.; Stanzani, E.; Martínez-Soler, F.; Tortosa, A.; Pineda, E.; Aldecoa, I.; et al. Preclinical Studies with Glioblastoma Brain Organoid Co-Cultures Show Efficient 5-ALA Photodynamic Therapy. *Cells* **2023**, *12*, 1125. <https://doi.org/10.3390/cells12081125>

Academic Editors: Elvira Immacolata Parrotta and Giovanni Cuda

Received: 1 March 2023

Revised: 25 March 2023

Accepted: 3 April 2023

Published: 10 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: The high recurrence of glioblastoma (GB) that occurs adjacent to the resection cavity within two years of diagnosis urges an improvement of therapies oriented to GB local control. Photodynamic therapy (PDT) has been proposed to cleanse infiltrating tumor cells from parenchyma to ameliorate short long-term progression-free survival. We examined 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-mediated PDT effects as therapeutic treatment and determined optimal conditions for PDT efficacy without causing phototoxic injury to the normal brain tissue. Methods: We used a platform of Glioma Initiation Cells (GICs) infiltrating cerebral organoids with two different glioblastoma cells, GIC7 and PG88. We measured GICs-5-ALA uptake and PDT/5-ALA activity in dose-response curves and the efficacy of the treatment by measuring proliferative activity and apoptosis. Results: 5-ALA (50 and 100 µg/mL) was applied, and the release of protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence measures demonstrated that the emission of PpIX increases progressively until its stabilization at 24 h. Moreover, decreased proliferation and increased apoptosis corroborated the effect of 5-ALA/PDT on cancer cells without altering normal cells. Conclusions: We provide evidence about the effectiveness of PDT to treat high proliferative GB cells in a complex in vitro system, which combines normal and cancer cells and is a useful tool to standardize new strategic therapies.

Keywords: 5-ALA; 3D tumor models; neurological cancers; drug screening; glioblastoma; organoids; personalized medicine; spheroids; photodynamic therapy

1. Introduction

Glioblastoma (GB) remains the most frequent primary brain tumor in adults, with an incidence of 4–5 cases per 100,000 persons per year and a median overall survival time of 15 months [1]. Less than 9.8% of patients with GB achieve 5-year survival, representing the lowest survival rate of malignant brain tumors [2]. The standard treatment is tumor resection followed by concomitant radiotherapy associated with Temozolomide and posterior sequential Temozolomide (STUPP-protocol) [3,4]. Ultimately, curative treatment is still lacking for GB despite all efforts that have been made.

One aspect to consider is that GB invariably recurs in a more aggressive form, and, importantly, more than 80% of the recurrences are located adjacent to the resection cavity. This phenomenon is thought to derive from micro-tumoral infiltration of the vessels and white matter tracts [5,6], which goes inadvertent during surgery, and from senescence-induced changes after radiotherapy [7,8]. Thus, to prevent tumor recurrence and improve patient survival rates, a plausible solution would be a locally-delivered therapy able to eliminate the microscopic disease left after surgical resection. In this sense, the photosensitizer 5-aminolevulinic acid (5-ALA) could become an appropriate aid [9,10].

Already, 5-ALA represents a standard alley for intraoperative fluorescence-guided oncologic neurosurgery, allowing visualization of the tumor margins and infiltrating regions. Additionally, the 5-ALA compound is a precursor to the potent photosensitizer, protoporphyrin IX (*PpIX*). When *PpIX* is excited by 635 nm light, it generates triplet oxygen species triggering cytotoxicity as a photosensitizer [11–16]. Therefore, if we use both the fluorophore and photosensitizer (PS) capabilities of protoporphyrin IX (*PpIX*) at the same time, we will be able to visually identify neoplastic tissue and, at the same time, we can selectively destroy that tissue, thus improving the GB treatment success. This synergistic mechanism of action, which integrates both diagnostic and therapeutic capabilities into a theragnostic single product, named photodynamic therapy (PDT), has provided exciting prospects for optimizing treatment outcomes in GB [17]. Finally, a major challenge of PDT is attaining an even delivery of the photostimulation over the irregular surgical cavity without causing thermal injury to the normal brain tissue. We have modeled human cerebral organoid-glioblastoma initiating cells (GICs) co-cultures to test different PDT strategies with 5-ALA against the tumor and their possible effect in the surrounding parenchyma. This model allows the evaluation of both the therapeutic efficacy and the eventual damage to normal cells.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Cultures

2.1.1. Tumorsphere Cultures

GICs from two different glioblastoma subtypes: proneural (GIC7) (from Dr. Marta María Alonso, Department of Pediatrics, Clínica Universidad de Navarra, University of Navarra, Pamplona, Spain) and mesenchymal (PG88), were obtained from human GB specimens as previously described and characterized by their different radio-sensibility [18–20]. Both types of GICs belong to non-mutated and non-G-CIMP subtypes and grow up as tumorspheres in non-laminin coated plates and in adhesion on 7.5 mg/mL laminin-coated plates (Sigma, St. Louis, MO, USA) [21]. Cells were maintained in a complete Neuronal Stem Cell (NSC) medium constituted by Dulbecco's Modified Eagle Medium and Nutrient Mixture F-12, DMEM/F12, (Invitrogen Waltham, MA, USA; 11320-033), containing 2 mM glutamine, supplemented with N_2 (Gibco A1370701), 4.5% glucose (Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 1M Hepes (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2% BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA), 20 ng/mL FGF-2 (R&D Systems; 233-FB-25/CF), and 20 ng/mL EGF (R&D Systems; 236-EG-200), at 37 °C, in a humidified 5% CO_2 and 5% O_2 atmosphere (hypoxia conditions), to simulate brain microenvironment (Heracell 150i incubator). GICs were infected with lentiviral vectors carrying green fluorescent protein (GFP) to trace the tumor burden growing in each organoid [22].

2.1.2. Cerebral Organoids

The human BjiPSC-SV4F-9 cell line was used to generate neurocortical brain organoids. For patterning of neurocortical spheroids, pluripotent BjiPSC-SV4F-9, colonies cultured on Geltrex (Invitrogen, Waltham, MA, USA; A15696-01) were lifted with TrypLE™ Express (Gibco, Carlsbad, CA, USA; 12605) at 37 °C for 5 min. Single cells were transferred to individual low adherence V-bottom 96-well plates (S-Bio Prime, Hudson, NY, USA; MS-9096VZ) in 200 µL of spheroid starter media with 10 µM Rock inhibitor Y-27632 (Calbiochem, San Diego, CA, USA; 688001), 10 µL dorsomorphin (Sigma, San Luis, MO, USA; PS499), and 10 µM SB-431542 (Sigma, San Luis, MO, USA; S4317). Spheroid starter media was DMEM/F12 (Invitrogen, Waltham, MA, USA; Invitrogen, Waltham, MA, USA; Invitrogen, Waltham, MA, USA; 11320-033), containing 20% KnockOut Serum (Invitrogen, Waltham, MA, USA; Invitrogen, Waltham, MA, USA; 1287-010), non-essential amino acids (Invitrogen, Waltham, MA, USA; 11140050), Glutamax (Invitrogen, Waltham, MA, USA; 35050061), β-mercaptoethanol, and 100 U/mL penicillin–streptomycin. The same media without a ROCK inhibitor was used for the next 5 days, after which the media was changed to Neurobasal-A-based spheroid media. Neurobasal-A spheroid media was composed of Neurobasal-A medium (Invitrogen, Waltham, MA, USA; 10888022) with B-27 serum substitute without vitamin A (Invitrogen, Waltham, MA, USA; 12587), Glutamax (Invitrogen, Waltham, MA, USA; 35050061), and 100 U/mL penicillin–streptomycin. From day 7 to day 25, 20 ng/mL FGF-2 (R&D Systems, McKinley Place NE, MN; 233-FB-25/CF) and 10 ng/mL EGF (R&D Systems, McKinley Place NE, MN; 236-EG-200) were added to the Neurobasal-A spheroid media and the spheroids were cultured in 96-well plates through day 25, with daily half-media changes. Fresh FGF-2 and EGF were added daily. The medium was renewed daily from day 7 to 15 and every other day from day 17 to 25. At day 20, spheroids were collected in a 15 mL tube (using a 10 mL strippette) and transferred to ultra-low attachment 6-well plates (Corning, New York, NY, USA; CLS3471) at a density of 8–10 spheroids per well and cultured through the remainder of the protocol in 2 mL of media per well. Neural differentiation was induced between days 27 and 41 by Neurobasal-A spheroid media supplemented with 20 ng/mL BDNF (R&D Systems, McKinley Place NE, MN; 248-BD) and 20 ng/mL NT-3 (R&D Systems, McKinley Place NE, MN; 267-N). Half-volume media changes were performed every other day between days 27 and 41. From day 41 spheroids were maintained in Neurobasal-A spheroid media for the generation of assembled GICs from each cell line and were added either as single cells or as tumorspheres, 2000 cells, or 2 tumorspheres for each organoid. For each condition, 16 wells were used to obtain 16 replicates for each co-culture scenario, both GFP-GIC7 and GFP-PG88 as single cells or tumorspheres. The co-cultured was maintained for 20 days before cells were fixed, on different days, for immunofluorescence analysis.

2.2. Double Immunofluorescence (IF) Analysis

Whole organoids were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min, washed with PBS prior to overnight incubation in 30% (weight/volume) sucrose at 4 °C, and embedded in OCT. Cryosections of 12 µm were obtained with Leica CM1950 cryostat (Leica Biosystems, Barcelona, Spain) and stored at −80 °C for long storage. Sections were then allowed to equilibrate at room temperature, encircled with the hydrophobic super PAN pen (Sigma-Aldrich, Z672548-1EA, Madrid, Spain), and dried for 5 min. The sections were permeabilized in 0.4% Triton X-100 rinsed and blocked in 5% goat serum at room temperature. Then, the sections were incubated overnight with primary antibodies: anti-Ki67 (Anti-Ki67 antibody ab16667, Abcam, UK) at 1/150 dilution, anti-TUJ1 (1:200; Sigma, T5076, Saint Louis, MO, USA) to study the neuron-specific class III beta-tubulin expression, and anti-*GFAP* (1:100; Dako, Z0334, Santa Clara, CA, USA) in a humidified chamber. The following secondary antibodies were used: Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (1:250; Invitrogen, A11005, Bleiswijk, The Netherlands) and Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit (1:200; Invitrogen, A21246, Bleiswijk, The Netherlands). Sections were mounted and nuclei stained in Fluoromount DAPI (SouthernBiotech, 0100-20, Birmingham, AL, USA). Images

were captured at 10 $\times$, 20 $\times$, and 40 $\times$ magnifications, using an Olympus BX41 (I.C.T, S.L., Barcelona, Spain) inverted fluorescence microscope. Images were analyzed using ImageJ.

To compare different areas of the tumor-organoid co-cultures, at least three immunofluorescence (IF) slides from replicate samples were evaluated and analyzed in at least three fields of each sample. Then, we evaluated the IF area of protein after normalizing the background. Results were expressed as the mean and standard deviation of protein expression values at each condition to be statistically compared.

2.3. TUNEL Analysis

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was determined to analyze apoptotic cells in tumor-organoid co-cultures. We used ApopTag In Situ Detection Kit (Merck Millipore, S7165, Darmstadt, Germany). Samples were obtained as described above. Tissue cryosections were air-dried at room temperature for 5 min, rinsed in PBS 1X, post-fixed, and permeabilized in precooled ethanol: acetic acid 2:1 for 5 min at -20°C . After washing three times, sections were incubated briefly at room temperature with an equilibration buffer and then incubated for 1 h at 37°C with TdT enzyme reaction mixture in a humidified chamber, which was stopped by stop/wash buffer for 10 min at room temperature, prior to incubating with anti-digoxigenin conjugate (rhodamine-labeled) for 30 min avoiding exposure to light.

Fluor mount DAPI was used as a nuclear counterstain. Images were taken with an Olympus BX41 (I.C.T, S.L., Barcelona, Spain) fluorescence microscope using standard fluorescein excitation and emission filters.

Images were analyzed using ImageJ v1.53 to assess the percentage of dead cells. TUNEL-positive nuclei (pink/magenta) were counted at different fields of each sample and at least in three different slices from replicates, considering tumor areas and non-tumor areas of each field.

2.4. Photo Dynamic Therapy (PDT)

2.4.1. 5-ALA Treatment and Viability Assays in Glioblastoma Cell Cultures

The viability under 5-ALA treatment and irradiation was assessed in GIC7 and PG88 cells, both as adherent cultures and growing as tumorspheres. For the cytotoxicity assessment at different concentrations in the two cell lines, cells were seeded in flat-bottomed laminin-coated 96-well plates at 10^4 cells/well density. For the establishment of organoid co-cultures, we used tumorspheres in uncoated U-shaped plates to facilitate centrifugation steps of 5 min at 800 rpm, carried out to perform media replacements. Different plates were used for the non-irradiated cells, and different irradiation intensities were applied (0.6, 1.2, 2.4, and 4.8 J/cm^2). After 24-h incubation (48 h in the case of tumorspheres), the media was removed, and new media with different concentrations of 5-ALA (100, 50, 25, 12.5, 6.25, and $3.75\text{ }\mu\text{g/mL}$) prepared from the 5-ALA 8 mg/mL stock solution were added. Untreated cells were incubated in the same medium composition without 5-ALA. The 5-ALA concentrations and distribution throughout all the plates prepared were identical. After 24 h of incubation, the medium was renewed, and each plate was exposed for different times (0, 15, 30, 60, and 120 s) using a Suntest CPS (Atlas, USA) solar simulation unit equipped with a xenon arc lamp (200–800 nm). The irradiance was set to 400 mW/m^2 , resulting in the irradiation doses mentioned above ($4.8, 2.4, 1.2$, and 0.6 J/cm^2). Plates were placed again in the incubator under standard conditions for 24 additional hours. Then, cell viability was assessed using the CytoTox96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega, San Francisco, CA, USA) under the manufacturer's instructions. Four hours after the addition of the resazurin reagent (24 h in the case of neurospheres), fluorescence was measured using a fluorescence plate reader at 560/590 nm excitation/emission (Infinite M Plex, Tecan). The viability was represented as the percentage of fluorescence with respect to the untreated cells in each of the plates.

2.4.2. 5-ALA Treatment and Viability Assays in Glioblastoma Cell Cultures

Kinetic assays to evaluate *PpIX* generation in tumorspheres were performed in 96-well plates. GIC7 and PG88 cells were seeded at 10^4 cells/well in 100 μ L of media and incubated for 48 h to leave cells to self-aggregate into tumorspheres. Then, plates were centrifuged for 5 min at 800 rpm, and the medium was replaced by 100 μ L of medium containing 5-ALA at 100 and 50 μ g/mL. The 5-ALA stock solution was prepared from the powder at 8 mg/mL using culture medium and NaOH 1M to neutralize the solution to pH 7 (specifically, 60 μ L of NaOH 1M were added to a final volume of 1.25 mL for 10 mg of 5-ALA powder). The solution was sterilized using a 0.22 μ m filter before use and kept frozen for further uses. Untreated cells were incubated using the same medium composition without 5-ALA. Six replicates were performed for each concentration. The metabolism of 5-ALA to *PpIX* was evaluated at different time points using a fluorescence plate reader at 405/635 nm excitation/emission (Infinite M Plex, Tecan Trading AG, Switzerland). Plates were taken from the incubator for fluorescence reading and placed back in the incubator until the next kinetic time point. The plate lid was not removed for the measurement to preserve the plate sterility, and the fluorescence intensity was measured from the bottom of the plate. For calculations, the fluorescence values from untreated cells were subtracted from the fluorescence values obtained at each time.

2.4.3. 5-ALA/PDT Treatment of GFP-GICs Co-Cultures

The experiment was carried out in two twin 96-cell plates, one for irradiation at 1.2 J/cm² and the other used as non-irradiated control. In each plate, there were at least six replicates of brain organoids alone, GIC7 and PG88 cells as tumorspheres alone, brain organoids co-cultured with GIC7, and brain organoids co-cultured with PG88.

The treatment with 5-ALA (50 μ g/mL) or medium alone was added to the cell wells, and after 24 h, plates were irradiated or not at 1.2 J/cm² as described above. At this point, *PpIX* and GFP fluorescence was measured (405/635, excitation/emission, and 485/530 excitation/emission, respectively) at 12 different points of each well to capture the fluorescence from the entire well surface. These measurements were done without removing the plate lid and from the bottom of the plate. Additionally, 25 μ L of the cell media were taken to perform the lactate dehydrogenase (*LDH*) assay (Promega, San Francisco, CA, USA) to have a measure of cell death just after irradiation. Next, plates were incubated again for 24 additional hours, and the GFP fluorescence measurement was carried out again. This procedure was repeated at 72 h post-irradiation. To determine the effect of 5-ALA/PDT on the GICs-tumorspheres viability, the GFP ratio between the fluorescence endpoint measurements and the first measurement after irradiation was obtained. The global cell viability of each well was determined using the *LDH* assay, using the ratio between the *LDH* present in the medium 72 h post-irradiation and the amount in the same well just after irradiation ($t = 0$). Since the amount of *LDH* released to the medium correlates with cell death, increasing values of this ratio indicated cell death enhancement under the specific experimental conditions tested. Additionally, at 72 h post-irradiation, pictures were taken under the GFP filter using a high-resolution microscope EVOS M7000 (Invitrogen, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.5. Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Two-tailed Student's *t*-test (to compare two experimental groups) or ANOVA (to compare three or more groups) were performed for data analysis using GraphPad Prism v.5.0 Software for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Bonferroni post-test was performed to compare replicate means. For all statistical methods, $p < 0.05$ was considered significant and was denoted as: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

3. Results

3.1. GICs Co-Cultured with Cerebral Organoids Generate a 3D Model of GB Tumor into the Normal Brain-like Structures

The pluripotent stem cell line BjiPSC-SV4F-9 cell line owned the intrinsic ability to self-organize into brain-like structures (so-called brain organoids) after subsequent 3D culture conditions [23] evolving from neuronal progenitors into neurons and glial cells at days 30 and 42, respectively (Figure 1A).

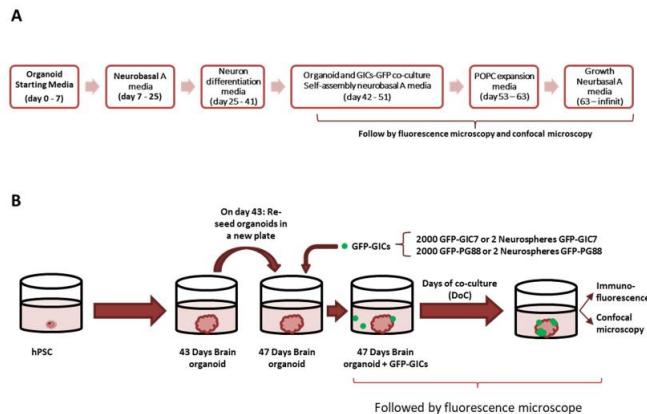


Figure 1. Schematic protocol of hiPSC cell cultures to induce neurocortical organoids and their co-culture with GFP-GICs. (A) Schematic protocol for neural induction of organoid cultures. The medium has been changed sequentially as indicated to obtain the different cell lineages. (B) On day 47, the GFP-GICs were seeded on top of the organoids to study their infiltration capacity on organoids. The obtained assembloid was followed by fluorescence microscopy until the end of the experiment when some of them were preserved for further histological analysis and confocal microscope imaging.

The multicellular aggregate derived from induced pluripotent stem cells can generate a group of polarized neural progenitors mimicking the developing cortex. The conformed brain organoids contained cells expressing neural, stem, and glial cell markers, as confirmed by immunofluorescence (Figure 2). Cell clusters at day 43 of culture expressed *TUBB3* (*TUJ1*), a marker of the early stage of differentiation of neuronal cells, and *GFAP*, compatible with astrocytes and radial glial cells. Moreover, the transcription factor *SOX2*, an embryonic stem-cell marker [24], was expressed homogeneously in the cell mass; the same occurred with the *O4* marker, which marks the oligodendrocytes [25]. These organoids were used to model GB invasion and infiltration by establishing GICs co-cultures of GIC7 and PG88 cells, previously infected with lentiviruses carrying green fluorescence protein (*GFP*), facilitating the identification of GFP-GICs co-cultured with organoids.

GFP-GICs were co-cultured with cortical brain organoids at day 43 of differentiation, representing a time-point displaying neurons and astrocytic cells (Figure 1A,B). Co-culture was performed by adding, for each GIC line, two tumorspheres or 2000 isolated GFP-GICs per organoid. These proportions induced successful engraftments in both GFP-GIC7 and GFP-PG88 cells (Figure 1B).

We microscopically monitored the tumor cells' growth in the organoid at least 30 days of co-culture (DoC) (Figure 3A). The GFP-GICs in contact with the organoid started their engraftment 24 h after the setting up of the co-culture. On DoC 15, we observed that GFP-GIC7 and GFP-PG88 adhered to the organoid surface, infiltrating the organoid and growing on it (Figure 3A). On DoC 41, the organoids were analyzed by confocal microscopy

to visualize the cell bulk of tumor infiltration (Figure 3B), confirming that both GFP-GICs efficiently invaded and proliferated into the brain organoid.

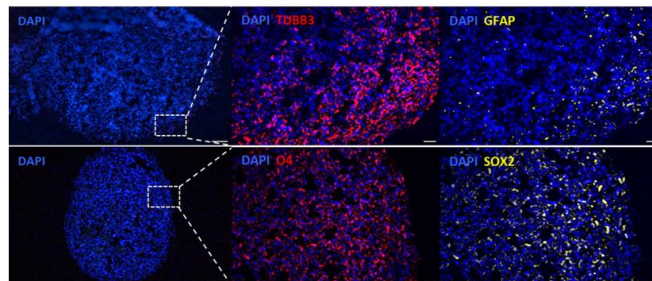


Figure 2. Immunofluorescence labeling of two differentiated organoids at day 43. The left panels show sections of organoids with blue nuclei stained with Fluoromount DAPI, scale Bar = 100 µm (10×). The dashed-line square represents the field visualized at higher magnification in the subsequent panels. The upper figures show the presence of neurons TUBB3 (red) and astrocytes GFAP (yellow). The bottom panels show oligodendrocytes O4 (red) and embryonic stem cells SOX2 (yellow). Scale bar 20 µm (40×).

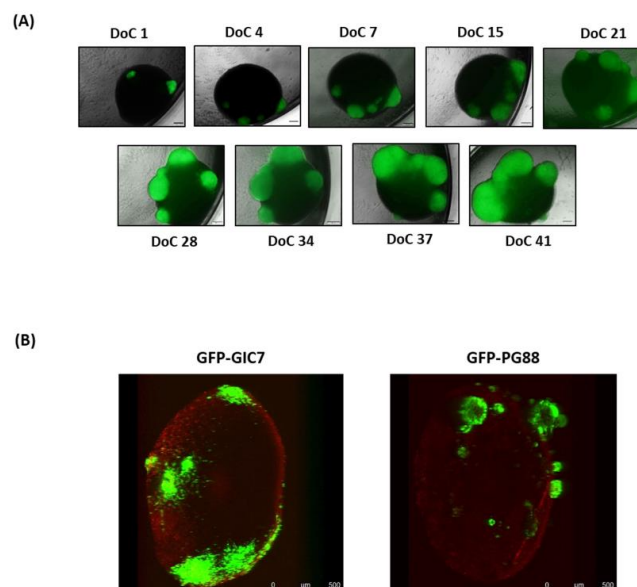


Figure 3. Follow-up of organoid-GICs co-culture by microscope. (A) Co-culture of GFP-GIC7 seeded as tumorspheres on top of the cerebral organoid, followed by fluorescence microscopy. Images were obtained from 1 to 41 days of co-culture (DoC) with a Microscopy Olympus IX51 at 4× magnification. Scale bar 200 µm. (B) Brain organoids were engrafted with 2000 single GFP-GICs proneural (left) and 2000 single GFP-mesenchymal (right) 24 days after seeding cells, which had already been differentiating for 47 days. Images were obtained with the confocal microscope. Scale bar 500 µm.

3.2. Phenotypic Characterization of GFP-GICs Co-Cultured with Cerebral Organoids Shows an Astrocyte Accumulation at the Scar Area

We followed the progression of GFP-GIC growth into organoids in co-cultures replicate ($n = 3$) from DoC 24 to 37 to check if any expression changes occurred in cell populations along with the tumor growth (Figure S1). Assembled replicates showed similar and homogeneously distributed *TUJ1*⁺ neuronal cells (Figure S1A). In contrast, GFAP⁺ astrocytes were progressively located closer around the tumor from DoC 24 to DoC 31 and DoC 37 (Figure S1B) when we followed GFP-GICs-organoids growth. A significant progressive increase of GFAP protein expression from DoC 24 to 37 ($p < 0.05$) surrounding tumor masses concerning the expression on peripheral areas was observed (Figure S1C). Moreover, additional morphological changes occurred on GFAP⁺ cells at DoCs 31 and 37, which changed from small and rounded to elongated, suggesting a glial infiltration around the tumor. Since the elongated GFAP⁺ cells around the GFP-GICs indicate reactive astrocytes, the process extension toward the injury site might mimic a glial scar [26] to protect the healthy tissue.

3.3. Tumor Engraftment Shows Effective Cell Surface Cell Growth as Well as Infiltration Capability of the GIC Cells into the Brain Organoids

We carried out co-cultures of GFP-GICs on differentiated brain organoids, either in the form of tumorspheres or as disaggregated GFP-GICs, for both GFP-GIC7 and GFP-PG88 cells. We did not find statistical differences between both GFP-GIC-organoid co-culture engraftment and growth either GICs were added as single cells or as tumorspheres (Figure 4). Moreover, both GFP-GICs invaded the organoid inside since both GFP-GICs were found in depth when consecutive organoid tissue slides were performed (Figure S2).

The striking ability of GFP-GICs to proliferate and infiltrate the cerebral organoid simulated the infiltrative phenotype of glioblastoma tumors. This cellular framework provided a potential mechanism to cell–cell signaling and intrinsic secretion of growth factors, guiding neuronal and glial development, altogether supplying a perfect microenvironment to GFP-GICs invasion infiltrating organoids.

3.4. Irradiation of 5-ALA Treated Glioblastoma Cells Induces Cytotoxicity

A kinetic study was performed to evaluate the production of *PpIX* after 5-ALA incubation in GIC7 and PG88 glioblastoma cells. Two different concentrations of 5-ALA (50 and 100 µg/mL) were applied to tumorspheres GIC7 and PG88 cell lines, and the release of *PpIX* fluorescence was measured at 1, 2, 4, 8, 24, and 30 h. The results indicate that in both cell lines, *PpIX* is produced already in the first hour after 5-ALA addition at all concentrations tested, and its production increases with time until 24 h. After this time, *PpIX* levels start to stabilize (Figure 5). However, clear differences can be observed between the two cell lines, especially at 50 µg/mL. GIC7 tumorspheres showed a higher capacity to metabolize 5-ALA into *PpIX* compared to PG88 tumorspheres ($p < 0.005$). However, at higher concentrations of 5-ALA (100 µg/mL), the production of *PpIX* was similar in both cell lines.

To analyze the effects of *PpIX* photoactivation, both GIC7 and PG88 adherent cells were treated with different concentrations of 5-ALA, ranging from 3 to 100 µg/mL, to better assess cell cytotoxicity. After 24 h, different irradiation doses were applied to the cultures, from 0.6 to 4.8 J/cm². Figure 6 shows the cell viability assessed 24 h later in both GIC7 (Figure 6 top) and PG88 (Figure 6 bottom) cells. Very low cytotoxicity (between 10 to 20% of cell death) was observed under 5-ALA treatment at concentrations below 50 µg/mL. However, clear effects on cell viability were observed at 50 µg/mL, and these were irradiation dose-dependent. At this concentration, the 0.6, 1.2, and 2.4 J/cm² irradiation doses reduced the viability to 53, 32, and 18%, respectively. The irradiation dose of 4.8 J/cm² almost killed all the cells, similar to what was observed at 100 µg/mL 5-ALA at 1.2, 2.4, and 4.8 J/cm² irradiation.

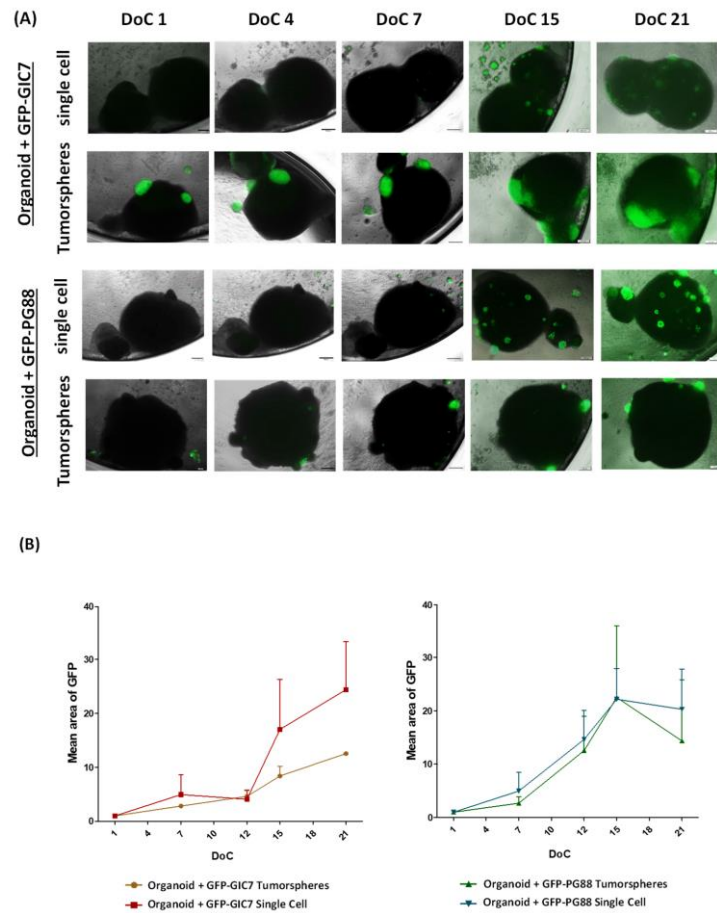


Figure 4. Study of the tumor engraftment effectiveness. (A) Merge of fluorescence and phase-contrast images of GFP-GIC7-organoid co-cultures at days 1, 4, 7, 15, and 21 after the engraftment (DoC). Both GFP-GIC7 (top panels) and GFP-PG88 (bottom panels), seeded as tumorspheres or as a single cell, as indicated, achieve infiltration of the organoid generating a viable tumor. Both GFP-GICs grew around and inside the organoid. Images at 4× obtained with Microscope Olympus IX51 are shown. Scale bar 200 μm. (B) Semi-quantitative analyses of tumor growth expressed as the mean of tumor area (GFP positive area), concerning the total organoid, evaluating GFP fluorescence of GFP-GIC7 (left) and GFP-PG88 (right) seeded as tumorspheres or single cells. To normalize the data and homogenize the different co-cultures, the initial GFP fluorescence on DoC 1 was used to evaluate each well and to compare the GFP area. The data are representative of the tumor engraftment effectiveness of both GFP-GICs. An ANOVA test was used to compare the means of 4 different conditions for every DoC and each situation for every DoC vs. the first DoC. DoC = Days of co-culture.

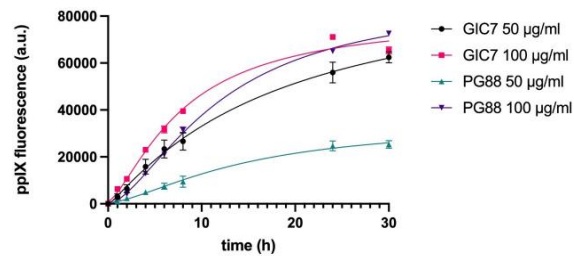


Figure 5. Kinetic study of *PpIX* emission of GICs. Both GIC7 and PG88 tumorspheres were treated at 50 and 100 µg/mL of 5-ALA and *PpIX* fluorescence was analyzed. Results show the mean $\pm$ SE of three independent experiments ($n = 3$) performed in triplicate and measured periodically until 30 h after 5-ALA administration.

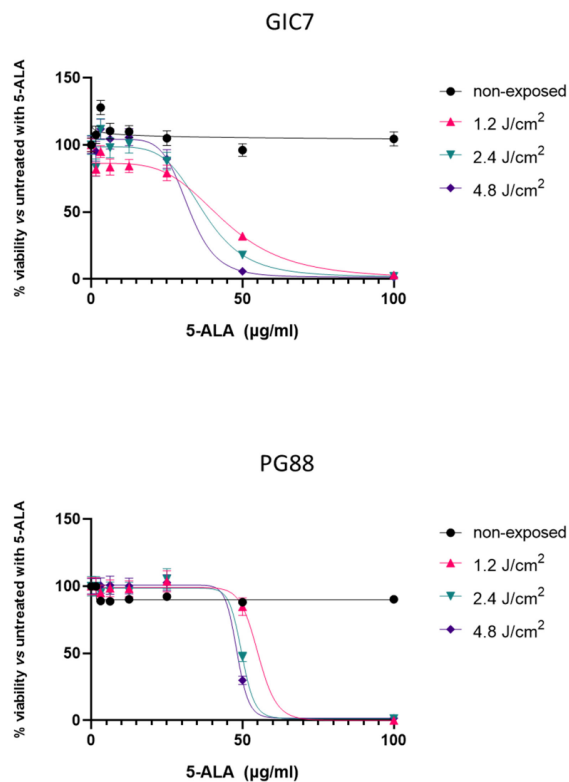


Figure 6. GIC7 (top) and PG88 (bottom) cell viability under different conditions of photodynamic therapy. The plot is representative of three independent experiments performed in both adherent cells in quadruplicate. Irradiation was applied at 1.2–4.8 J/cm². The percentage of cell viability after 5-ALA treatment (0–100 µg/mL) was calculated with regard to control cells without treatment.

When the results of GIC7 and PG88 adherent cells were compared under 50 µg/mL of 5-ALA and 1.2 J/cm² irradiation, a higher resistance of PG88 to the therapy was observed (Figure 7A). Under these experimental conditions, the GIC7 culture had 75% of cell mortality, whereas PG88 cells presented no effects on cell viability. A similar experiment using GICs tumorspheres showed more resistance of PG88 to the 5-ALA combined with irradiation treatment ($p < 0.05$) than GIC7 cells ($p < 0.005$), as shown in Figure 7B.

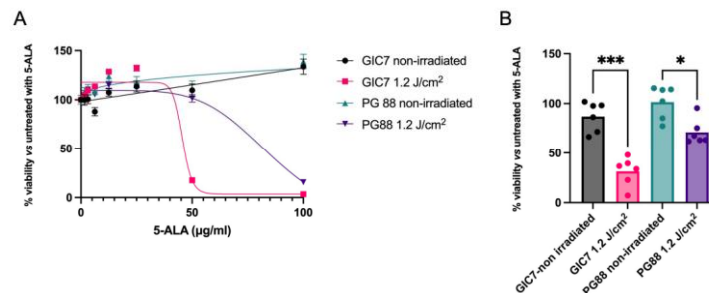


Figure 7. Comparison of GIC7 and PG88 cells' behavior under 5-ALA treatment (0–100 µg/mL) and irradiation. (A) Dose-response comparison of adherent cell cultures with different 5-ALA concentrations treated with 1.2 J/cm² irradiation. (B) Cell viability comparison between GIC7 and PG88 tumorspheres under 5-ALA 50 µg/mL and 1.2 J/cm² irradiation. Results are representative of three independent experiments ($n = 3$) performed in triplicate. * p value < 0.05 ; *** p value < 0.005 .

3.5. Photodynamic Therapy Induces Cell Death to Glioblastoma Cells Infiltrated in Cerebral Organoids

Next, the PDT was applied to the tumorsphere-organoid co-culture. The fluorescence emitted by the GFP protein of the GICs was used to assess the different viability of tumor and normal cells in the co-culture. In addition, the global cell viability was assessed by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) release to the medium 72 h after irradiation. Brain organoids, GICs tumorspheres, and their co-cultures were treated using 50 µg/mL of 5-ALA for 24 h (Figure S3). Then, an irradiation dose of 1.2 J/cm² was applied to one of the two twin plates to induce the photoactivation of PpIX; the other plate was used as a control. At this point, the production of PpIX was confirmed in each of the wells by fluorescence, and cell viability was then measured at 24 and 72 h post-irradiation to assess the efficacy of PDT-inducing tumor cell death.

As shown in Figure S4, there were no significant changes in cell viability at 24 h, as reported by the GFP fluorescence measurements. However, after 72 h, a clear decrease in GFP fluorescence was observed between the GIC7 cells alone ($p = 0.005$) and in those co-cultured with the brain organoids ($p = 0.01$) (Figure 8A). Additionally, a decreasing tendency of PG88 fluorescence alone and in co-culture was observed, although it was not statistically significant. The LDH assay corroborated these results. As shown in Figure 8B, the ratio of LDH release at 72 h with respect to time 0 was significantly enhanced for the GIC7 ($p < 0.05$) and PG88 ($p < 0.05$) cultures alone and in co-culture with the brain organoids, where the differences increased in both cells ($p < 0.005$). However, the release of LDH did not increase in the control organoid wells cultured alone under the same conditions, indicating that the PDT was selectively inducing cell death in glioblastoma cells and was not affecting the cell viability of the organoids.

The fluorescence pictures taken at 72 h post-irradiation confirmed these results (Figure S3). The intensity of GFP fluorescence was shown to decrease under 5-ALA treatment followed by irradiation.

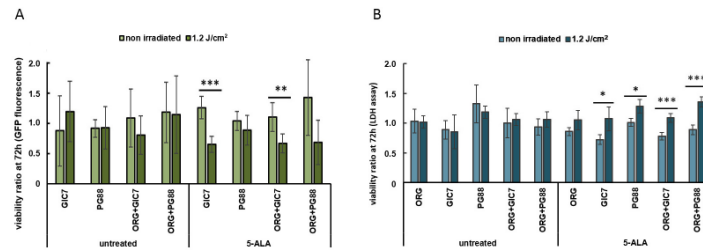


Figure 8. Cell viability after PDT of tumorspheres alone and co-cultured with brain organoids. (A) GICs viability after 72h post-irradiation using the GFP fluorescence ratio between each endpoint and time 0. (B) Global cell viability considering the ratio between the LDH release at 72 h post-irradiation and at time 0. Results are the mean $\pm$ SE of two independent experiments ($n = 2$) performed using six replicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

In addition, we performed IF analysis of GIC-organoid co-cultures after treatment to evaluate cell death using the TUNEL technique (Figure 9). The number of apoptotic cells increased after PDT in invasive lesions with regard to areas not invaded by GICs. Then, the number of GFP-GICs decreased in both GIC7 (Figure 9A) and PG88 (Figure 9B).

We compared apoptosis of GICs invading organoids with apoptosis in organoid surrounding areas without GICs (Figure 9C,D). The percentage of apoptotic cells was similar in 5-ALA control GIC7-co-cultures than after PDT treatment, 21% vs 26%, respectively ($p = 0.30$) (Figure 9C, small cheese graphic to the left side of the big one); and in 5-ALA control PG88-co-cultures than after PDT treatment, 17% vs 19%, respectively ($p = 0.41$) (Figure 9D, small cheese graphic to the left side of the big one). Therefore, PDT per se was unable to induce apoptosis in normal brain-organoid cells.

Moreover, apoptosis increased in tumors from GICs invading organoids after PDT either GIC7, 17% vs 37% ($p < 0.0001$) (Figure 9C, small cheese graphic to the right side of the big one) or PG88, 18% vs 31% ($p < 0.0001$) (Figure 9D, small cheese graphic to the right side of the big one). These results suggested that apoptosis was the cell death mechanism secondary to 5-ALA PDT, involving mainly tumor cells that capture the photosensitizer, whereas brain-organoid cells were not affected.

On the other hand, *Ki67* was used to evaluate the proliferation of GICs into invaded organoids. *Ki67* decreased in GIC7 (Figure 10A) and PG88 cells (Figure 10B) after PDT suggesting a decreased proliferation ratio. The analysis of GIC7 5-ALA control samples showed 59% of positive nuclei vs 24% of positive nuclei on PDT-treated GIC-7 co-cultures ($p < 0.0001$) (Figure 10C, small cheese graphic to the right side of the big one). PG88 5-ALA control co-cultures had 63% of positive *Ki67* cells with regard to PG88 PDT treated co-cultures that had 29% of positive *Ki67* nuclei ($p = 0.010$) (Figure 10D, small cheese graphic to the right side of the big one). Thus, from these experiments, we concluded that PDT might effectively treat both pro-neural and mesenchymal GB cells, limiting their proliferative activity without damaging normal cells.

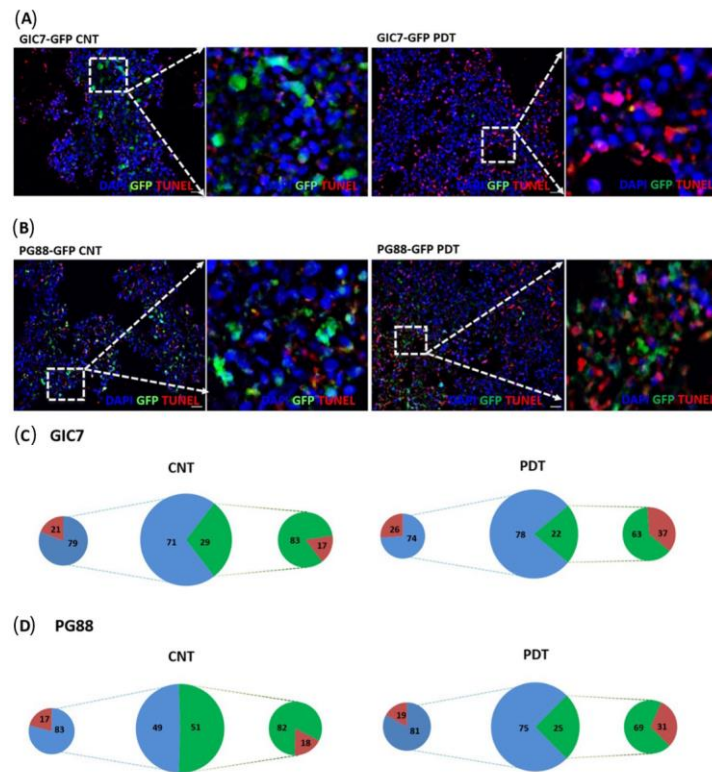


Figure 9. TUNEL analysis of GFP-GICs and organoid co-culture. TUNEL of GIC7-organoid co-cultures (A) and PG88-organoid co-cultures with 5-ALA (B) no treated (CNT) (left panels) or treated (right panels) with photodynamic therapy (50 $\mu\text{g/mL}$ with 5-ALA, 1.2 J/cm^2 irradiation). At 20 $\times$ (big squares), the scale bar is 20 μm . 5-ALA controls (GIC7-GFP CNT or PG88-GFP CNT) without PDT and PDT-treated (GIC7-GFP PDT or PG88-GFP PDT) visualizing the red TdT-DIG-rhd cells and apoptotic bodies accumulated more in treated tissue at the tumor areas (green fluorescent cells) than in 5-ALA-controls (blue). Few apoptotic cells were scattered in non-infiltrated brain-organoid tissue (blue) in both 5-ALA-control and PDT-treated co-cultures. Blue DAPI-stained nuclei were used to counterstain cells. Semi-quantitative analysis of samples: GIC7 5-ALA CNT, 12 fields from 2 samples; GIC7 PDT-treated, 19 fields from 3 samples; PG88-5-ALA CNT, 7 fields from 2 samples and PG88 PDT-treated, 17 fields from 3 samples, was done. Semi-quantitative analysis is represented as a percentage average of positive cells on (C,D) pictures: green color (GFP-GICs cells), blue organoid cells, and red TdT-DIG-rhd positive cells; comparing controls (left part) and PDT samples (right part). Significant differences between GIC7-5-ALA CNT and GIC7-PDT-treatment ($p = 0.0001$) and between PG88-5-ALA CNT and PG88-PDT-treatment ($p < 0.001$) were found. (C) Cell counts show similar TdT-positive cells in organoid areas surrounding tumors (normal cells) and more TdT-positive cells in treated organoids than untreated samples (D).

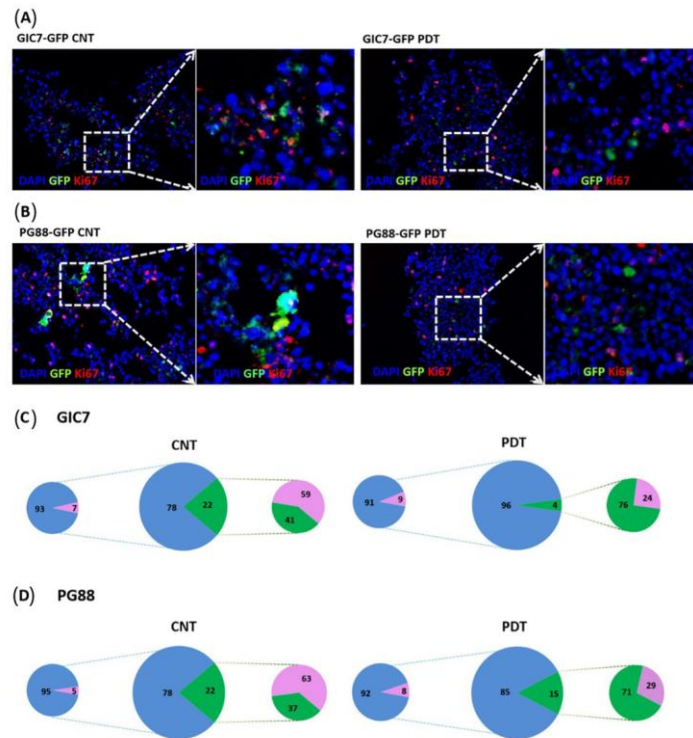


Figure 10. Proliferation study of GFP-GICs and organoids co-culture by Ki67. GIC7 and PG88-organoid co-cultures treated or not with PDT based on 5-ALA uptake after 5-ALA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ treatment or medium alone. Fixed tissues were sliced at 12 μm to perform IF analysis with anti-Ki67 antibody (pink staining), scale bars 20 μm . Green fluorescent GICs infiltrated the organoid (green color), GIC7 (A) and PG88 (B) 5-ALA controls (left panels) show less positive pink nuclei (amplified in the small square at right) than PDT treated co-cultures (besides and amplified at right panels). Blue DAPI-stained nuclei were used to counterstain cells. Semiquantitative analysis of Ki67 positive cells was performed from: GIC7-5-ALA CNT, 7 fields from 1 sample; GIC7-PDT treated, 13 fields from 2 samples; PG88-5-ALA CNT, 8 fields from 1 sample and PG88-PDT treated, 11 fields from 2 samples. Results as a percentage average of positive cells are represented in (C,D) pictures: green color (GFP-GICs cells), blue DAPI-stained nuclei, and pink Ki67 positive cells; comparing controls (left part) and PDT samples (right part). Significant differences between GIC7-5-ALA CNT and GIC7-PDT-treatment ($p = 0.0001$) and between PG88-5-ALA CNT and PG88-PDT-treatment ($p < 0.01$) were found.

4. Discussion

Curing patients with a GB will require a better understanding of neuroscience and brain tumor biology to prevent tumor recurrence and improve patient survival rates. We show a new accurate preclinical model to test plausible solutions based on locally-delivered therapy, able to eliminate the microscopic disease left after surgical resection.

GIC-organoid co-cultures recapitulate many aspects of the disease and can be used to assess the efficacy of local therapies for GB, in particular, PDT with 5-ALA, allowing the

assessment of eventual collateral damage to the surrounding brain parenchyma. Moreover, testing the efficacy of local treatment in a human microenvironment provides outcomes that can be extrapolated more accurately to the clinical setting.

Based on the induced pluripotent stem cell line BjiPSC-SV4F-9, the organoid model recapitulates the human brain development from induced pluripotent stem cells to cells expressing mature central nervous system (CNS) markers. We show that organoids are self-organized and differentiated in vitro, exhibiting similar features in cell-type diversity as in the developing human brain. Furthermore, GICs co-cultured with human-brain organoids are a successful in vitro model to study glioblastoma diffuse invasion and proliferation, mimicking the human brain microenvironment and the crosstalk between a cancer cell and normal cerebral tissue. Indeed, this 3D co-culture system helps explore new glioblastoma treatments with elements that are not recapitulated using a standard 2D culture system.

An interesting observation in co-cultures is the increased population of GFAP⁺ cells around the tumor from DoC 24 to 37. This cellular migration might be attributed to differences in the tumor microenvironment as it has been postulated that astrocyte interactions with glioma cells are essential for glioma invasion [27–29]. Still, if astrocytes become outnumbered by glioma cells, they can no longer protect neurons from glioma cell glutamate secretion and excitotoxicity [27]. Indeed, our model provides an additional tool to analyze gap junctions in astrocytes, which might be a crucial target for manipulation in preventing glioma invasion since the difference in the invasiveness of GB can be partly attributed to the surrounding astrocytes [28].

Of particular interest would be to determine the ability of the tumor to respond to local therapies, which could become part of the neurosurgical resources [30–34]. Organoids could inform of both the antitumorigenic effect of these therapies and the potential collateral damage to the surrounding brain tissue. In this context, special attention has been aroused by photodynamic therapy [35–40].

In this context, 5-ALA PDT stands as a very convenient pro-therapy since the molecule is already a standard of care to guide surgical resection in GB. As a fluorophore, 5-ALA delineates macroscopically the tumor margins and maximizes the extent of resection [41–43]. After resection, the photosensitizer effect of 5-ALA can be elicited by stimulation at a higher wavelength and PDT administered in the same surgical act.

Specific photosensitizers like 5-ALA are able to absorb photons, generate fluorescence and trigger phototoxic processes that become detrimental for the tumor cells [44], based on the generation of reactive oxygen species (ROS), resulting in cancer cell death mainly due to the activation of apoptosis [45]. 5-ALA is a non-proteinogenic amino acid produced from glycine and succinyl-CoA in mitochondria by ALA synthase. It is a precursor of phototoxic protoporphyrin IX (PpIX) in the heme biosynthesis pathway [46,47] with a strong absorption band in the 380–420 nm spectrum, emitting red fluorescence at 635–704 nm. *PpIX* is reported to preferentially accumulate in cancer cells over non-tumor cells, although the precise mechanism underlying this is unknown [44,48–50].

Furthermore, the GICs-organoid co-culture is a system able to detect functional differences between GB phenotypes. Lower production of *PpIX* by PG88 under the same conditions could explain the higher resistance of these cells to the therapy.

Besides efficacy, safety evaluation is the other crucial aspect to assess in a prospective therapy. In our experiments, significant cell death did not occur after exposing the control organoids to PDT under the same conditions, indicating that the PDT was selectively inducing cell death in glioblastoma cells without affecting the cell viability of neural and glial cells surrounding the tumor. These results indicate that co-culturing GICs with brain organoids is a reproducible model to analyze PDT efficacy and other new strategic therapies to fight against GIC cells, including the therapeutic consequences over the tumor and normal cells.

5. Conclusions

We provide evidence that brain organoids co-cultured with GICs are a powerful cancer avatar to study the effectiveness of therapeutic approaches, modeling the symbiosis between normal and malignant cells and providing a real insight into the tumor-microenvironment interaction. According to our *in vitro* experiments, PDT seems to specifically target glioblastoma cells while sparing the surrounding tissue. This locally-derived therapy could be an effective adjuvant after surgical resection against microscopic invasion, although these results deserve further investigation in *in vivo* preclinical models.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12081125/s1>, Figure S1: Immunofluorescence (IF) analyses of GFP-PG88-co-cultured with the cerebral organoid; Figure S2: Invasive ability of GFP-GICs into organoids; Figure S3: Comparison between co-cultures of brain organoids engrafted with GIC7 and PG88 GFP-GICs cells; Figure S4: Cell viability after PDT of tumorspheres alone and co-cultured with brain organoids; Video S1: Video obtained with confocal microscope on day 24 of co-culture of brain organoids with 2000 single GFP-GIC7. Scale bar 500 μ m; Video S2: Video obtained with confocal microscope on day 24 of co-culture of brain organoids with 2000 single GFP-PG88. Scale bar 500 μ m.

Author Contributions: Conceptualization, L.P., À.S., J.J.G.S., C.B., A.S., M.M.-T. and M.C.; methodology, L.P., C.B., D.D. and À.S.; investigation, L.P., C.B., D.D., A.S., À.S. and J.J.G.S.; resources, E.S., F.M.-S. and A.T.; data curation, L.P., C.B., A.S., À.S. and J.J.G.S.; writing—original draft preparation, L.P., C.B., D.D., A.M., A.F., À.S., J.J.G.S. and A.S.; writing—review and editing, L.P., C.B., D.D., A.M., A.F., E.S., F.M.-S., A.T., E.P., I.A., M.M.-T., M.C., A.S., À.S. and J.J.G.S.; supervision, C.B., A.S., À.S. and J.J.G.S.; funding acquisition, À.S., J.J.G.S., M.M.-T. and M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded Laboratorios Gebro Pharma S.A. The authors also received support from the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs, the ISCIII-Subdirección General de Evaluación, AECC (Spanish Association Against Cancer. Project GCTRA16015SEDA) and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) FIS-PI18/00916. A.S. was supported by the grant PGC 2018-098626-B-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by the ERDF A way of making Europe, the grant PDC 2022-133826-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by the European Union Next Generation EU/PRTR and the Merck Salud Foundation grant RL001213. A.S. is a recipient of a Ramón y Cajal contract supported by the Grant (RYC-2016-19962) funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by the “ESF investing in your future”. C.B. is a recipient of Grant CEX2018-000794-S funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors acknowledge the financial support from Laboratorios Gebro Pharma S.A. to set up this project (LGP Study code: LGP17-19). L.P. and D.D. acknowledge AECC (Spanish Association Against Cancer. Project GCTRA16015SEDA). L.P., A.S., and J.J.G.S. thank Marta Maria Alonso, Department of Pediatrics, University of Navarra for the kind gifts of Glioma initiating cells (GICs) proneural GIC7 and AECC (Spanish Association Against Cancer). C.B. was supported by MCIN/AEI/10.13039/501100011033. A.S. was supported by the projects (PDC2022-133826-I00 and PGC2018-098626-B100) funded by the MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ERDF ‘A way of making Europe’ and the Merck Salud Foundation. AS is a recipient of a Ramón y Cajal contract (RYC-2016-19962) funded by the MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and ‘ESF Investing in your Future’.

Conflicts of Interest: Marc Centellas and Marta Muñoz-Tudurí are employees of Laboratorios Gebro Pharma S.A.; the rest of the authors declare no conflict of interest.

References

- Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro Oncol.* **2021**, *23*, 1231–1251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Thakkar, J.P.; Dolecek, T.A.; Horbinski, C.; Ostrom, Q.T.; Lightner, D.D.; Barnholtz-Sloan, J.S.; Villano, J.L. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2014**, *23*, 1985–1996. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.B.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 459–466. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [\[CrossRef\]](#)
- Diksin, M.; Smith, S.; Rahman, R. The Molecular and Phenotypic Basis of the Glioma Invasive Perivascular Niche. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2342. [\[CrossRef\]](#)
- Quail, D.F.; Joyce, J.A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 326–341. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, J.; Cazzato, E.; Ladewig, E.; Frattini, V.; Rosenbloom, D.I.S.; Zairis, S.; Abate, F.; Liu, Z.; Elliott, O.; Shin, Y.-J.; et al. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 768–776. [\[CrossRef\]](#)
- Turnquist, C.; Beck, J.A.; Horikawa, I.; Obiorah, I.E.; Von Muhlinen, N.; Vojtesek, B.; Lane, D.P.; Grunseich, C.; Chahine, J.J.; Ames, H.M.; et al. Radiation-induced astrocyte senescence is rescued by $\Delta 133p53$. *Neuro Oncol.* **2019**, *21*, 474–485. [\[CrossRef\]](#)
- Stummer, W.; Pichlmeier, U.; Meinel, T.; Wiestler, O.D.; Zanella, F.; Reulen, H.-J.; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: A randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* **2006**, *7*, 392–401. [\[CrossRef\]](#)
- Mahmoudi, K.; Garvey, K.L.; Bouras, A.; Cramer, G.; Stepp, H.; Raj, J.G.J.; Bozcek, D.; Busch, T.M.; Hadjipanayis, C.G. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *J. Neurooncol.* **2019**, *141*, 595–607. [\[CrossRef\]](#)
- Ewelt, C.; Nemes, A.; Senner, V.; Wölfer, J.; Brokinkel, B.; Stummer, W.; Holling, M. Fluorescence in neurosurgery: Its diagnostic and therapeutic use. Review of the literature. *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *148*, 302–309. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Aguilar, L.R.; Vilchez, M.L.; Sanabria, L.N.M. Targeting glioblastoma stem cells: The first step of photodynamic therapy. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2021**, *36*, 102585. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Li, Y.; Wang, D.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Liang, Z.; Liu, F.; Chen, L. Photodynamic therapy enhances the cytotoxicity of temozolomide against glioblastoma via reprogramming anaerobic glycolysis. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2023**, *42*, 103342. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ferrés, A.; Di Somma, A.; Mosteiro, A.; Topczewski, T.E.; Roldán, P.; Pedrosa, L.; Diao, D.; Pineda, E.; Sierra, A.; Enseñat, J.; et al. Photodynamic therapy in glioblastoma: Detection of intraoperative inadvertent 5-ALA mediated photodynamic therapeutical effect after gross total resection. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 1080685. [\[CrossRef\]](#)
- Rothe, F.; Patties, I.; Kortmann, R.-D.; Glasow, A. Immunomodulatory Effects by Photodynamic Treatment of Glioblastoma Cells In Vitro. *Molecules* **2022**, *27*, 3384. [\[CrossRef\]](#)
- Jeising, S.; Geerling, G.; Guthoff, R.; Hänggi, D.; Sabel, M.; Rapp, M.; Nickel, A.-C. In-Vitro Use of Verteporfin for Photodynamic Therapy in Glioblastoma. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2022**, *40*, 103049. [\[CrossRef\]](#)
- Cramer, S.W.; Chen, C.C. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma. *Front. Surg.* **2020**, *6*, 81. [\[CrossRef\]](#)
- Alonso, M.M.; Diez-Valle, R.; Manterola, L.; Rubio, A.; Liu, D.; Cortes-Santiago, N.; Urquiza, L.; Jauregi, P.; De Munain, A.L.; Sampron, N.; et al. Genetic and Epigenetic Modifications of Sox2 Contribute to the Invasive Phenotype of Malignant Gliomas. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26740. [\[CrossRef\]](#)
- Galli, R.; Binda, E.; Orfanelli, U.; Cipelletti, B.; Gritti, A.; De Vitis, S.; Fiocco, R.; Foroni, C.; Dimeco, F.; Vescovi, A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7011–7021. [\[CrossRef\]](#)
- Moreno, M.; Pedrosa, L.; Paré, L.; Pineda, E.; Bejarano, L.; Martínez, J.; Balasubramanian, V.; Ezhilarasan, R.; Kallarakal, N.; Kim, S.-H.; et al. Differentiation and Radioresistance in Glioblastoma Article GPR56/ADGRG1 Inhibits Mesenchymal Differentiation and Radioresistance in Glioblastoma. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 2183–2197. [\[CrossRef\]](#)
- Frenster, J.D.; Placantonakis, D.G. Establishing Primary Human Glioblastoma Tumorsphere Cultures from Operative Specimens. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1741*, 63–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Han, J.H.; Yoon, J.S.; Chang, D.Y.; Cho, K.G.; Lim, J.; Kim, S.S.; Suh-Kim, H. CXCR4-STAT3 axis plays a role in tumor cell infiltration in an orthotopic mouse glioblastoma model. *Mol. Cells* **2020**, *43*, 539–550. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Madhavan, M.; Nevin, Z.S.; Shick, H.E.; Garrison, E.; Clarkson-Paredes, C.; Karl, M.; Clayton, B.L.L.; Factor, D.C.; Allan, K.C.; Barbar, L.; et al. Induction of myelinating oligodendrocytes in human cortical spheroids. *Nat. Methods.* **2018**, *15*, 700–706. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Novak, D.; Hüser, L.; Elton, J.J.; Umansky, V.; Altevogt, P.; Utikal, J. SOX2 in development and cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *67 Pt 1*, 74–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

25. Zhang, Y.; Lu, X.-Y.; Casella, G.; Tian, J.; Ye, Z.-Q.; Yang, T.; Han, J.-J.; Jia, L.-Y.; Rostami, A.; Li, X. Generation of oligodendrocyte progenitor cells from mouse bone marrow cells. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 247. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Escartin, C.; Galea, E.; Lakatos, A.; O'Callaghan, J.P.; Petzold, G.C.; Serrano-Pozo, A.; Steinhäuser, C.; Volterra, A.; Carmignoto, G.; Agarwal, A.; et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat. Neurosci.* **2021**, *24*, 312–325. [\[CrossRef\]](#)
27. Takano, T.; Lin, J.H.-C.; Arcuino, G.; Gao, Q.; Yang, J.; Nedergaard, M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1010–1015. [\[CrossRef\]](#)
28. Filous, A.R.; Silver, J. Targeting astrocytes in CNS injury and disease: A translational research approach. *Prog. Neurobiol.* **2016**, *144*, 173. [\[CrossRef\]](#)
29. Pantazopoulou, V.; Jeannot, P.; Rosberg, R.; Berg, T.; Pietras, A. Hypoxia-Induced Reactivity of Tumor-Associated Astrocytes Affects Glioma Cell Properties. *Cells* **2021**, *10*, 613. [\[CrossRef\]](#)
30. Blue, R.; Miranda, S.P.; Gu, B.J.; Chen, H.I. A Primer on Human Brain Organoids for the Neurosurgeon. *Neurosurgery* **2020**, *87*, 620–629. [\[CrossRef\]](#)
31. Krivoschapkin, A.; Gaytan, A.; Abdullaev, O.; Salim, N.; Sergeev, G.; Marmazeev, I.; Cesnulis, E.; Killeen, T.; Tyuryn, V.; Kiselev, R.; et al. Prospective comparative study of intraoperative balloon electronic brachytherapy versus resection with multidisciplinary adjuvant therapy for recurrent glioblastoma. *Surg. Neurol. Int.* **2021**, *12*, 517. [\[CrossRef\]](#)
32. Yanan, A.M.D.; Pascual, J.S.G.; Cruz-Lim, E.M.D.; Ignacio, K.H.D.; Cañal, J.P.A.; Khu, K.J.O. Intraoperative radiotherapy for glioblastoma: A systematic review of techniques and outcomes. *J. Clin. Neurosci.* **2021**, *93*, 36–41. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Zhang, J.; Chen, C.; Li, A.; Jing, W.; Sun, P.; Huang, X.; Liu, Y.; Zhang, S.; Du, W.; Zhang, R.; et al. Immunostimulant hydrogel for the inhibition of malignant glioma relapse post-resection. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16*, 538–548. [\[CrossRef\]](#)
34. Pena, E.S.; Graham-Gurysh, E.G.; Bachelder, E.M.; Ainslie, K.M. Design of Biopolymer-Based Interstitial Therapies for the Treatment of Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13160. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Vermandel, M.; Dupont, C.; Lecomte, F.; Leroy, H.-A.; Tuleasca, C.; Mordon, S.; Hadjipanayis, C.G.; Reyns, N. Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma patients: A preliminary analysis of the INDYGO clinical trial. *J. Neuro Oncol.* **2021**, *152*, 501–514. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Leroy, H.-A.; Baert, G.; Guerin, L.; Delhem, N.; Mordon, S.; Reyns, N.; Vignion-Dewalle, A.-S. Interstitial Photodynamic Therapy for Glioblastomas: A Standardized Procedure for Clinical Use. *Cancers* **2021**, *13*, 5754. [\[CrossRef\]](#)
37. Yang, Y.; Hu, Y.; Wang, H. Targeting Antitumor Immune Response for Enhancing the Efficacy of Photodynamic Therapy of Cancer: Recent Advances and Future Perspectives. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 5274084. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Lietke, S.; Schmutzer, M.; Schwartz, C.; Weller, J.; Siller, S.; Aumiller, M.; Heckl, C.; Forbrig, R.; Niyazi, M.; Egensperger, R.; et al. Interstitial Photodynamic Therapy Using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences. *Cancers* **2021**, *13*, 1767. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Tetard, M.-C.; Vermandel, M.; Leroy, H.-A.; Leroux, B.; Maurage, C.-A.; Lejeune, J.-P.; Mordon, S.; Reyns, N. Interstitial 5-ALA photodynamic therapy and glioblastoma: Preclinical model development and preliminary results. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2016**, *13*, 218–224. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Sanabria, L.M.; Rodríguez, M.E.; Cogno, I.S.; Vittar, N.B.R.; Pansa, M.F.; Lamberti, M.J.; Rivarola, V.A. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1835*, 36–45. [\[CrossRef\]](#)
41. Mazurek, M.; Kulesza, B.; Stoma, F.; Osuchowski, J.; Mańdziuk, S.; Rola, R. Characteristics of Fluorescent Intraoperative Dyes Helpful in Gross Total Resection of High-Grade Gliomas—A Systematic Review. *Diagnostics* **2020**, *10*, 1100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Gandhi, S.; Meybodi, A.T.; Belykh, E.; Cavallo, C.; Zhao, X.; Syed, M.P.; Moreira, L.B.; Lawton, M.T.; Nakaji, P.; Preul, M.C. Survival Outcomes Among Patients With High-Grade Glioma Treated With 5-Aminolevulinic Acid-Guided Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 620. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Mirza, A.B.; Christodoulides, I.; Lavrador, J.P.; Giamouriadis, A.; Vastani, A.; Boardman, T.; Ahmed, R.; Norman, I.; Murphy, C.; Devi, S.; et al. 5-Aminolevulinic acid-guided resection improves the overall survival of patients with glioblastoma—a comparative cohort study of 343 patients. *Neuro Oncol. Adv.* **2021**, *3*, vdab047. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Vasilev, A.; Sofi, R.; Rahman, R.; Smith, S.J.; Teschemacher, A.G.; Kasparov, S. Using Light for Therapy of Glioblastoma Multiforme (GBM). *Brain Sci.* **2020**, *10*, 75. [\[CrossRef\]](#)
45. Traylor, J.; Pernik, M.; Sternisha, A.; McBrayer, S.; Abdullah, K. Molecular and Metabolic Mechanisms Underlying Selective 5-Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence in Gliomas. *Cancers* **2021**, *13*, 580. [\[CrossRef\]](#)
46. Yang, X.; Li, W.; Palasuberniam, P.; Myers, K.A.; Wang, C.; Chen, B. Effects of Silencing Heme Biosynthesis Enzymes on 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Protoporphyrin IX Fluorescence and Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91*, 923–930. [\[CrossRef\]](#)
47. Roberts, D.W.; Olson, J.D.; Evans, L.T.; Kolste, K.K.; Kanick, S.C.; Fan, X.; Bravo, J.J.; Wilson, B.C.; Leblond, F.; Marois, M.; et al. Red-light excitation of protoporphyrin IX fluorescence for subsurface tumor detection. *J. Neurosurg.* **2018**, *128*, 1690–1697. [\[CrossRef\]](#)
48. Ishizuka, M.; Abe, F.; Sano, Y.; Takahashi, K.; Inoue, K.; Nakajima, M.; Kohda, T.; Komatsu, N.; Ogura, S.-I.; Tanaka, T. Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 358–365. [\[CrossRef\]](#)

49. Yoshioka, E.; Chelakkot, V.S.; Licursi, M.; Rutihinda, S.G.; Som, J.; Derwish, L.; King, J.J.; Pongnopparat, T.; Mearow, K.; Larijani, M.; et al. Enhancement of Cancer-Specific Protoporphyrin IX Fluorescence by Targeting Oncogenic Ras/MEK Pathway. *Theranostics* **2018**, *8*, 2134–2146. [[CrossRef](#)]
50. Mazurek, M.; Szczepanek, D.; Orzyłowska, A.; Rola, R. Analysis of Factors Affecting 5-ALA Fluorescence Intensity in Visualizing Glial Tumor Cells—Literature Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 926. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

DISCUSSIÓ

La teràpia fotodinàmica ha suscitat un gran interès científic en els últims anys com a adjuvant terapèutic per a múltiples neoplàsies, entre elles les que s'originen a les cèl·lules glials, en concret els astròcits, al sistema nerviós central.

És en aquest últim escenari, i per combatre específicament el tumor primari del sistema nerviós central amb pitjor pronòstic; el Glioblastoma, on cada vegada més grups científics han destinat els seus esforços en l'estudi de l'eficàcia i de la seguretat de la teràpia fotodinàmica amb àcid 5-Aminolevulínic, tant com a adjuvant terapèutic, com a tractament de rescat en els pacients als qui no se'ls hi pot oferir cap altra opció terapèutica eficaç.

Cal destacar, també, que gran part de l'interès en l'estudi de la teràpia fotodinàmica enfront del GB és arran de l'estandardització de l'ús de la resecció guiada per fluorescència mitjançant l'àcid 5-Aminolevulínic en aquesta estirp tumoral tal com s'ha explicat en l'apartat d'introducció.

L'àmplia disponibilitat d'aquest compost en els centres especialitzats, la familiaritat dels professionals en el seu ús, l'especificitat del 5-ALA per acumular-se dins les cèl·lules tumorals, el descobriment de les seves propietats fotodinàmiques i el pronòstic infaust del GB, són els punts de partida que han permès evolucionar en el coneixement i aplicabilitat d'aquesta opció terapèutica.

Aquesta tesi doctoral pretén ampliar el coneixement que tenim actualment en relació amb la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA, especialment en aquelles qüestions on la bibliografia de qualitat disponible encara és escassa.

La discussió s'estructurarà seguint l'ordre dels objectius establerts prèviament per tal de mantenir el caràcter translacional dels estudis que conformen la tesi i emfatitzant en la importància de cadascun d'ells, també, per separat.

En primer lloc, arran de la falta de coneixement disponible en relació amb l'aplicabilitat, seguretat i eficàcia de la TFD amb 5-ALA sobre la cavitat quirúrgica immediatament després de la resecció, es va plantejar avaluar en una sèrie retrospectiva de pacients si l'ús

de la resecció guiada per fluorescència mitjançant 5-ALA en els pacients afectats de GB ha induït, de forma inadvertida, un efecte fotodinàmic terapèutic.

És àmpliament conegut que el GB és un tumor de naturalesa infiltrant, la qual cosa limita el control local i regional de la malaltia, derivant a la recurrència de la neoplàsia, especialment en contigüitat amb la cavitat quirúrgica prèvia.

La recurrència tumoral, consegüentment, n'impedeix la curació i resulta en el pronòstic infaust secundari a una alta i ràpida letalitat dels pacients afectats de GB (mitjana de supervivència de 15 mesos des del diagnòstic).

Pel que s'ha descrit en el paràgraf anterior, identificar nous tractaments que permetin millorar el control local i regional de la malaltia després de la resecció quirúrgica és d'alt interès científic.

Per tal de complir aquest objectiu, els autors van determinar que la millor variable d'estudi seria la presència de recurrència en el volum de parènquima comprès dins el primer centímetre des de la cavitat quirúrgica, o a partir d'aquest.

El punt de tall d'un centímetre es basa en la penetrància de la llum visible en el parènquima cerebral, fent que sigui el teixit susceptible a poder haver sigut tractat de forma inadvertida mitjançant la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA gràcies a les fonts lumíniques del mateix quiròfan.

En analitzar els resultats, aquests estan a favor d'una menor probabilitat de recurrència dins el primer centímetre respecte a la cavitat quirúrgica en aquells pacients als qui s'ha utilitzat la resecció guiada per fluorescència mitjançant 5-ALA. Aquests resultats favorables es van obtenir tant en l'anàlisi univariant com multivariant, i havent controlat les característiques de comparació intergrup al per tal de disminuir al màxim possible el biaix intrínsec de les cohorts retrospectives.

El fet d'haver obtingut aquest resultat positiu en l'estudi obre les portes a l'ús de la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA com a coadjuvant en el moment de la cirurgia per tal de controlar la malaltia a escala local i regional, augmentant la probabilitat de control tumoral sense necessitar una nova intervenció quirúrgica (com és en el cas de la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA realitzada a través de la introducció de múltiples filaments de fibra òptica guiats per estereotàxia) i permet aprofitar al màxim la dosi de 5-ALA que

s'ha administrat al pacient amb la finalitat de guiar la resecció quirúrgica. Podríem anticipar, doncs, que es tractaria d'una opció terapèutica eficient.

Tot i els resultats favorables obtinguts en aquest estudi, també cal destacar que té una sèrie de limitacions a tenir en compte, les quals exposem a continuació:

Tot i que tant en la planificació del treball com en l'anàlisi de resultats és important controlar al màxim el biaix, els mètodes utilitzats poden limitar la seva generalització, especialment pels criteris d'inclusió restrictius.

A més, la naturalesa retrospectiva de l'estudi comporta un biaix inherent malgrat els esforços per controlar-lo tant com sigui possible.

Com a possible limitació, també cal tenir en compte l'heterogeneïtat pel que fa al temps d'exposició a la llum en l'anàlisi dels resultats. Fent una valoració racional, es podria pensar que en aquells pacients als qui l'exposició lumínica ha sigut major, l'eficàcia de la TFD també ho ha sigut. No obstant això, es va detectar que la recurrència era menor en aquells pacients amb menor temps d'exposició lumínica. Malauradament, aquests resultats paradoxals i interessants no van complir la significança estadística.

Finalment, cal destacar com a limitació de l'estudi que existeix la possibilitat d'haver sobreestimat l'efecte de la TFD amb 5-ALA a causa de la menor quantitat de teixit patològic al voltant de la cavitat quirúrgica en tots els pacients analitzats, ja que un criteri d'exclusió era la resecció no completa del volum tumoral captant de contrast.

El fet d'haver conclòs que hem estat aplicant la TFD amb 5-ALA de forma concomitant amb la resecció quirúrgica forma part dels fonaments de coneixement en relació amb aquesta opció terapèutica i obre les portes a continuar indagant sobre la seva aplicabilitat.

Considerem que la nostra aportació pot servir com a fonament d'estudis futurs on s'avaluï en assajos clínics controlats i aleatoritzats l'eficàcia de la TFD amb 5-ALA, especialment quan l'aplicació és concomitant al tractament quirúrgic, i que les troballes que se'n derivin permetin adaptar els protocols terapèutics actuals.

En aquest sentit, i si l'eficàcia de la TFD amb 5-ALA en el tractament del GB es demostra en pacients, pensem que els principals beneficiaris poden ser aquells als qui la resecció

completa no és possible (per proximitat o infiltració del tumor en el teixit cerebral eloqüent) i que, per tant, tenen un pitjor pronòstic vital a curt termini.

Una vegada complert el primer objectiu de la tesi doctoral, els resultats obtinguts enllacen amb el segon objectiu d'aquesta, el qual consisteix a simular les implicacions esperables de la teràpia fotodinàmica en el moment de la seva aplicació en pacient, en termes d'eficàcia i seguretat, a través de l'ús de models de laboratori basats en el co-cultiu d'organoides cerebrals amb tumorsferes de GIC.

Tot i que en la literatura existeixen estudis "in vitro" d'eficàcia i seguretat de la TFD amb 5-ALA, cap d'aquests les valora en relació amb les GIC.

Les GIC, tal com s'ha explicat a la introducció, són les cèl·lules iniciadores de Glioma o cèl·lules mare de Glioma, les quals tenen un paper fonamental en la recidiva tumoral i, per tant, en el pronòstic.

Existeixen dos subtipus de GIC amb diferent implicació pronòstica: l'estirp proneural i l'estirp mesenquimal. Tot i que en qualsevol dels dos casos, el pronòstic és infaust, l'estirp proneural té millor pronòstic per menor taxa d'infiltració i menor resistència al tractament, especialment al tractament adjuvant (quimioteràpia i radioteràpia). Per altra banda, l'estirp mesenquimal confereix pitjor pronòstic, especialment per la resistència als tractaments adjuvants.

Poder-les eliminar és clau per tal de limitar la reaparició tumoral i poder aconseguir un millor control local i regional de la malaltia, amb els beneficis en la supervivència del pacient que això comporta.

A més, incloure en l'estudi les dues estirps tumorals ens permet avaluar si existeixen diferències en l'eficàcia de la TFD amb 5-ALA enfront de les GIC proneurals i mesenquimals.

En cas de ser efectiva en els dos supòsits, la TFD amb 5-ALA podria tenir un paper important en l'esquema terapèutic estàndard, especialment en aquells pacients amb pitjor pronòstic, és a dir, afectats amb GB amb GIC de l'estirp mesenquimal.

Addicionalment, aquest treball va més enllà del fet d'analitzar l'eficàcia i la seguretat "in vitro" de la TFD amb 5-ALA, ja que aquestes s'avaluen amb models de representació

innovadors, basats en el co-cultiu d'organoids cerebrals amb tumorsferes de GIC els quals permeten simular amb més fidelitat les condicions "in vivo".

El model de co-cultiu de tumorsferes de GIC i organoids cerebrals és capaç de representar amb un alt nivell de fidelitat molts aspectes de la malaltia, de manera que pot ser utilitzada per avaluar l'eficàcia de teràpies locals pel tractament del GB, com és el cas de la TFD amb 5-ALA.

Gràcies a aquests models, no només és possible avaluar l'eficàcia de la TFD amb 5-ALA sinó que també podem estudiar el dany col·lateral al parènquima cerebral circumdant.

El model d'organoide representa el desenvolupament cerebral humà des de les cèl·lules mare pluripotencials fins a les cèl·lules que expressen marcadors madurs del sistema nerviós central. Aquests organoides s'autoorganitzen i es diferencien "in vitro", exhibint característiques similars al cervell humà pel que fa al desenvolupament i diversitat cel·lular. A més, les cèl·lules mare del GB o cèl·lules iniciadores de GB (GIC) co-cultivades amb els organoides cerebrals, permeten estudiar la invasió difusa i la proliferació del GB, imitant el microentorn cerebral humà i el diàleg entre una cèl·lula tumoral i el teixit cerebral normal.

Aquest sistema de co-cultiu tridimensional permet explorar l'eficàcia d'aquests nous tractaments, entre ells la TFD amb 5-ALA, amb elements que no es representen en un sistema de cultiu bidimensional estàndard.

Addicionalment, als resultats obtinguts per tal de complir els objectius específics d'aquesta tesi, una observació interessant en els co-cultius va ser l'augment de la població de cèl·lules gials GFAP+ al voltant del tumor i la seva implicació en la migració i invasió cel·lular.

Aquesta migració cel·lular podria atribuir-se a diferències en el microentorn tumoral més que a les cèl·lules tumorals "per se", ja que s'ha proposat que les interaccions entre els astròcits i les cèl·lules del GB són essencials per tal d'afavorir-ne la invasió.

No obstant això, si els astròcits queden superats pel nombre de cèl·lules de glioma, aquests ja no poden protegir les neurones de la invasió i el dany cel·lular causat per la secreció de glutamat per part de les cèl·lules del GB.

El nostre model proporciona una eina addicional per tal d'analitzar les unions comunicants entre els astròcits, les quals podrien ser un objectiu crucial en teràpies que tinguin com a finalitat limitar la invasió del GB, ja que la capacitat d'invasió d'aquest pot atribuir-se, almenys en part, als astròcits que te al voltant.

El segon objectiu d'aquesta tesi se subdivideix en tres propòsits: Determinar l'eficàcia preliminar de la TFD amb 5-ALA sobre les GIC, detectar la selectivitat de la TFD amb 5-ALA sobre les GIC i conèixer la dosi lumínica òptima per a l'obtenció de la màxima lesió sobre les cèl·lules neoplàstiques a través de la TFD amb 5-ALA, sense induir dany fototèrmic a les cèl·lules cerebrals sanes.

L'eficàcia de la TFD amb 5-ALA es va poder constatar, tot i que de forma desigual segons l'estirp cel·lular de les GIC tractades. Malgrat que l'assimilació del 5-ALA no presenta diferències entre ambdues estirps cel·lulars, sempre que la dosi de 5-ALA sigui de 100 µg/mL, la mortalitat cel·lular en les GIC d'estirp proneural és superior a la mortalitat cel·lular de les GIC de l'estirp mesenquimal. Dit d'una altra manera, les cèl·lules d'estirp mesenquimal presenten certa resistència a la TFD amb 5-ALA.

Encara que les GIC d'estirp mesenquimal presentin un cert grau de resistència al tractament amb TFD amb 5-ALA, aquesta aconsegueix induir la mort cel·lular en aquest subgrup de pitjor pronòstic.

El fet d'haver demostrat aquesta eficàcia preliminar en ambdues estirps cel·lulars, obre les portes a realitzar estudis clínics on s'avaluï l'eficàcia de la TFD amb 5-ALA en pacients afectats de cadascun dels subtipus de GB existents. L'obtenció de dades de supervivència ens permetria, per una banda, individualitzar el tractament i, per altra banda, donar informació pronòstica de major qualitat al pacient.

Tot i que un tractament oncològic sigui eficaç enfront de la neoplàsia a qui va destinada, aquest no és suficient si no és selectiu. Aquesta afirmació ens porta a analitzar el segon propòsit del segon objectiu, en el qual es pretén determinar la selectivitat de la teràpia fotodinàmica amb 5-ALA sobre les GIC, preservant les cèl·lules cerebrals sanes.

En aquest treball, la selectivitat es va avaluar conjuntament amb l'eficàcia i a través de l'anàlisi de la fluorescència mitjançant el GFP ("Green Fluorescence Protein") i els nivells de LDH.

Totes les tumorosferes, independentment del grup d'anàlisi (5-ALA vs. "untreated") es van marcar amb GFP. Es va evidenciar una disminució estadísticament significativa de la GFP en els grups tractats enfront els no tractats per les GIC proneurals. Aquests resultats van a favor de l'eficàcia en aquest subgrup i la selectivitat es va evidenciar a través d'una anàlisi microscòpica d'immunofluorescència on s'aprecia la preservació de les cèl·lules cerebrals sanes.

La selectivitat, a més, va ser doblement analitzada amb la comparació dels nivells de LDH en els grups tractats enfront dels no tractats amb TFD amb 5-ALA. Tant pels estrips proneural com mesenquimal es va evidenciar un augment de l'LDH en les mostres tractades amb TFD amb 5-ALA enfront de les no tractades, donant suport bioquímic a la selectivitat, que se suma al demostrat a través de les imatges microscòpiques.

Finalment, l'últim propòsit consistia a determinar la dosi lumínica òptima per a l'obtenció del màxim dany sobre les cèl·lules neoplàstiques a través de la TFD amb 5-ALA, sense induir lesió fototèrmica a les cèl·lules cerebrals sanes.

En dur a terme els experiments amb múltiples dosis lumíniques, es va poder definir que la dosi òptima és d'1,2 J/cm².

Amb aquest treball, el nostre grup va poder concloure que la TFD amb 5-ALA, avaluada a través del co-cultiu de tumorosferes i organoids cerebrals, és eficaç especialment per les GIC d'estirp proneural tot i que també té efecte sobre les GIC de pitjor pronòstic (mesenquimals). A més, l'eficàcia és selectiva enfront de les cèl·lules tumorals, preservant el teixit cerebral sa.

Adicionalment, als resultats que s'han explicat amb anterioritat, es va detectar que el principal mecanisme de mort cel·lular induït per la TFD amb 5-ALA és l'apoptosi. No obstant això, també es va apreciar una disminució en la proliferació de les GIC que envaïen els organoids cerebrals a través d'una disminució del seu Ki67, tant per les GIC proneurals com mesenquimals.

Tot i els resultats favorables, hem de destacar que la principal limitació d'aquest estudi és el seu caràcter preclínic. Tot i que és indispensable avaluar les dades d'eficàcia, selectivitat i seguretat abans de plantejar un estudi clínic, aquest no ens permet extrapolar amb un elevat grau de fermesa els resultats que s'obtidrien amb els pacients.

No obstant això, el fet d'haver dut a terme l'anàlisi utilitzant el model de co-cultiu d'organoides cerebrals i tumorosferes ens permet anticipar-nos amb quins poden ser els resultats esperables en els estudis clínics que es realitzaran posteriorment amb pacients afectats de GB.

Els coneixements que es deriven dels projectes d'investigació que conformen aquesta tesi doctoral formen part dels fonaments de l'aplicabilitat de la TFD amb 5-ALA en el tractament del GB.

Tal com s'ha esmentat breument en l'apartat de la introducció, la TFD amb 5-ALA es pot aplicar de diverses formes i en diferents moments de la malaltia en els pacients afectats de GB.

En aquesta tesi estudiem, fonamentalment, la seva aplicació directa sobre el camp quirúrgic just en finalitzar l'exèresi tumoral per tal de tractar aquelles cèl·lules romanents que infiltren de manera difosa el parènquima cerebral circumdant. De totes les cèl·lules infiltrants, les que són d'especial interès a combatre mitjançant la TFD amb 5-ALA són les GIC.

En la literatura ja s'han plantejat dues formes d'aplicar la TFD amb 5-ALA sobre la cavitat quirúrgica: La primera d'elles és mitjançant la introducció de múltiples catèters de fibra òptica i la segona és a través d'un difusor globular.

Tot i que la primera és tècnicament més laboriosa, aquesta pot ser especialment interessant si la resecció quirúrgica ha sigut parcial (a causa de la proximitat o invasió d'àrees cerebrals eloqüents), ja que ens permet incidir especialment en aquell romanent tumoral que no pot ser extirpat.

Per altra banda, la segona opció és especialment interessant en aquells casos on la resecció tumoral ha sigut completa, ja que a través del difusor globular, el qual s'adapta a la cavitat quirúrgica, ens permet administrar de forma homogènia la dosi lumínica necessària per a aplicar la TFD amb 5-ALA a tota la perifèria de la cavitat quirúrgica.

Tanmateix, considerem que ambdós mètodes no son excloents, podent-se aplicar en combinació en aquells casos que així ho requereixin per tal d'obtenir la màxima eficàcia de la TFD amb 5-ALA.

Un altre possible avantatge de la TFD amb 5-ALA és que aquesta no només pot ser útil com adjuvant terapèutic una vegada finalitzada la resecció quirúrgica, sinó que pot tenir un paper transcendental en aquells pacients que no són candidats a exèresi quirúrgica clàssica; especialment a conseqüència de la proximitat o invasió del tumor en àrees cerebrals eloqüents.

Per tal finalitat, es proposa la introducció estereotàctica de múltiples sondes de fibra òptica, prèvia obtenció de biòpsia tumoral per tal de confirmar el diagnòstic. Aquestes sondes s'introdueixen dins el tumor o romanent tumoral, així com en el teixit cerebral que es troba a la perifèria, on s'administra la dosi lumínica necessària per a aconseguir l'efecte fotodinàmic de la PpIX.

És també especialment interessant aquest últim escenari, ja que els pacients afectats de GB i que no són candidats a exèresi quirúrgica presenten un pronòstic especialment infaust, amb una supervivència d'entre 3 a 6 mesos en funció de si poden rebre tractament amb quimioteràpia i radioteràpia o no. Considerem que disposar d'una opció terapèutica addicional, com és el cas de la TFD amb 5-ALA, podria millorar la supervivència d'aquests pacients.

Igualment, quan es presenta la recidiva tumoral, la qual forma part de la història natural de la malaltia independentment dels tractaments rebuts, la TFD amb 5-ALA pot tenir un paper important en el seu maneig. A més, en aquesta situació poden ser vàlides ambdues formes d'aplicació, la directa sobre la cavitat quirúrgica o a través de sondes de fibra òptica introduïdes mitjançant tècniques estereotàctiques.

En ser la recidiva tumoral part de la història natural de la malaltia, pensem que disposar de més opcions terapèutiques eficaces pot suposar un increment de la supervivència, amb la finalitat de cronificar l'evolució de la neoplàsia durant el màxim de temps possible.

Tot i que existeixen alguns estudis clínics que avaluen la TFD amb 5-ALA en el tractament del GB, la gran majoria tenen un caràcter descriptiu, la qual cosa no permet emetre conclusions fermes en relació amb la seva eficàcia, però sí que contribueixen en el gruix bibliogràfic necessari com a fonament per a justificar l'execució d'estudis clínics comparatius.

És per aquest motiu, doncs, que el següent pas consisteix a realitzar estudis clínics comparatius, és a dir, assajos clínics multicèntrics, per tal de demostrar si realment la TFD amb 5-ALA és eficaç mitjançant l'anàlisi de variables clínicament rellevants com seria la supervivència global, el temps lliure de malaltia i el temps lliure de progressió tumoral. A més, com a objectius secundaris, però no menys importants, és fonamental que s'incloguin dades de seguretat.

Cal plantejar un assaig clínic per cada un dels escenaris on la TFD amb 5-ALA pot ser utilitzada com a tractament adjuvant, és a dir, just després de la resecció quirúrgica, ja sigui l'exèresi tumoral primària o d'una recidiva, i com a tractament adjuvant en cas que l'exèresi quirúrgica no sigui possible, tant enfront del tumor primari com enfront de la recidiva tumoral.

Aquesta tesi doctoral en particular, obre la porta a l'ús de models "in vitro" complexos per a l'estudi de tractaments enfront del GB. En concret s'ha utilitzat per tal d'avaluar la TFD amb 5-ALA, però el mateix model podria ser aplicable a altres tractaments.

Tot i que aquests models representen amb gran fidelitat el binomi tumor-cervell a través del co-cultiu de tumorosferes i organoids cerebrals, és necessari seguir treballant amb el seu perfeccionament per tal de crear models que s'assemblin cada vegada més a la realitat i poder anticipar amb gran fidelitat els resultats que s'esperen obtenir en els estudis clínics.

L'ús de la TFD amb 5-ALA no és possible sense la tecnologia que ens permet administrar la dosi lumínica òptima a la diana terapèutica establerta. És necessari seguir treballant amb el desenvolupament de fonts i difusors lumínics, sondes de fibra òptica i sistemes de planificació i d'introducció estereotàctica d'aquestes.

El desenvolupament tecnològic engloba nombroses disciplines i és necessari que aquestes treballin en consonància per millorar la supervivència i qualitat de vida dels pacients afectats amb GB.

Finalment, cal seguir treballant per detectar i desenvolupar altres usos del 5-ALA com a agent citotòxic. En aquest aspecte i de forma recent, s'han descobert les propietats sonodinàmiques del 5-ALA.

De forma similar que amb la TFD, la teràpia sonodinàmica amb 5-ALA podria ser eficaç pel tractament dels pacients afectats de GB. Es considera que els àmbits d'aplicació poden ser similars als descrits per la TFD amb 5-ALA i, a més, es podria utilitzar de forma concomitant amb aquesta o davant de situacions en què no és possible l'ús de la TFD amb 5-ALA.

En relació amb aquest últim punt, la teràpia sonodinàmica no requereix la introducció de cap dispositiu dins l'encèfal per tal d'administrar la dosi d'ones ultrasòniques necessària, sinó que aquestes s'administrarien a través d'una font externa que en permetria l'acció en l'àrea cerebral planificada, similar al sistema FUS ("Focussed-Ultrasound Surgery").

La teràpia sonodinàmica, doncs, podria ser útil especialment en aquells pacients que no són candidats a cap mena d'intervenció quirúrgica, ni tan sols la introducció estereotàctica de les sondes de fibra òptica, principalment per contraindicació anestèsica.

Tal com hem observat al llarg d'aquest treball, el 5-ALA ens ofereix un ampli i esperançador ventall d'aplicacions en el tractament dels pacients afectats de GB, des de la cirurgia guiada per fluorescència, passant per la teràpia fotodinàmica i fins a la teràpia sonodinàmica.

CONCLUSIONS

Arran de les publicacions que conformen aquesta tesi doctoral podem extreure les següents conclusions:

1. S'ha aconseguit detectar l'efecte terapèutic fotodinàmic amb l'àcid 5-Aminolevulínic que ha tingut lloc de forma inadvertida en els pacients afectats de glioblastoma, als qui s'havia aconseguit una resecció tumoral completa, havien rebut el tractament adjuvant estàndard i induïda gràcies a les fonts lumíniques del mateix quiròfan.
2. Hem sigut capaços de crear un model complex "in vitro" a partir del co-cultiu de tumorosferes i organoides cerebrals que ens permetrà avaluar teràpies enfront del glioblastoma, entre elles la teràpia fotodinàmica amb àcid 5-Aminolevulínic.
3. S'ha demostrat l'eficàcia de la teràpia fotodinàmica amb àcid 5-Aminolevulínic enfront de les "Glioma Initiating Cells" d'estirp proneural i mesenquimal a través del model conformat per tumorosferes i organoides cerebrals.
4. S'ha determinat la dosi lumínica mínima eficaç per tal de poder aplicar la teràpia fotodinàmica amb àcid 5-aminolevulinic enfront de les "Glioma Initiating Cells" d'estirp proneural i mesenquimal a través del model conformat per tumorosferes i organoids cerebrals.
5. S'ha evidenciat la selectivitat i, per tant, la seguretat de la teràpia fotodinàmica amb àcid 5-Aminolevulínic enfront de les "Glioma Initiating Cells" d'estirp proneural i mesenquimal a través del model conformat per tumorosferes i organoids cerebrals.

BIBLIOGRAFIA

1. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol.* 2018;20(suppl_4):iv1-iv86.
2. Taphoorn MJ, Sizoo EM, Bottomley A. Review on quality of life issues in patients with primary brain tumors. *Oncologist.* 2010;15(6):618-26.
3. Amirian ES, Zhou R, Wrensch MR, Olson SH, Scheurer ME, Il'yasova D, et al. Approaching a Scientific Consensus on the Association between Allergies and Glioma Risk: A Report from the Glioma International Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(2):282-90.
4. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* 2007;25(4):867-90, vii.
5. Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(20):1544-50.
6. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(10):1985-96.
7. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231-51.
8. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
9. Gramatzki D, Roth P, Rushing EJ, Weller J, Andratschke N, Hofer S, et al. Bevacizumab may improve quality of life, but not overall survival in glioblastoma: an epidemiological study. *Ann Oncol.* 2018;29(6):1431-6.

10. Nava F, Tramacere I, Fittipaldo A, Bruzzone MG, Dimeco F, Fariselli L, et al. Survival effect of first- and second-line treatments for patients with primary glioblastoma: a cohort study from a prospective registry, 1997-2010. *Neuro Oncol.* 2014;16(5):719-27.
11. Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, et al. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2016;2(11):1460-9.
12. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2014;16(1):113-22.
13. Molinaro AM, Hervey-Jumper S, Morshed RA, Young J, Han SJ, Chunduru P, et al. Association of Maximal Extent of Resection of Contrast-Enhanced and Non-Contrast-Enhanced Tumor With Survival Within Molecular Subgroups of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *JAMA Oncol.* 2020;6(4):495-503.
14. Noorbakhsh A, Tang JA, Marcus LP, McCutcheon B, Gonda DD, Schallhorn CS, et al. Gross-total resection outcomes in an elderly population with glioblastoma: a SEER-based analysis. *J Neurosurg.* 2014;120(1):31-9.
15. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, Group AL-GS. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):392-401.
16. Eigenbrod S, Trabold R, Brucker D, Eros C, Egensperger R, La Fougere C, et al. Molecular stereotactic biopsy technique improves diagnostic accuracy and enables personalized treatment strategies in glioma patients. *Acta Neurochir (Wien).* 2014;156(8):1427-40.
17. Berntsen EM, Gulati S, Solheim O, Kvistad KA, Torp SH, Selbekk T, et al. Functional magnetic resonance imaging and diffusion tensor tractography incorporated into an intraoperative 3-dimensional ultrasound-based neuronavigation system: impact on therapeutic strategies, extent of resection, and clinical outcome. *Neurosurgery.* 2010;67(2):251-64.

18. Brindle KM, Izquierdo-Garcia JL, Lewis DY, Mair RJ, Wright AJ. Brain Tumor Imaging. *J Clin Oncol*. 2017;35(21):2432-8.
19. Abhinav K, Yeh FC, Mansouri A, Zadeh G, Fernandez-Miranda JC. High-definition fiber tractography for the evaluation of perilesional white matter tracts in high-grade glioma surgery. *Neuro Oncol*. 2015;17(9):1199-209.
20. Hervey-Jumper SL, Berger MS. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. *J Neurooncol*. 2016;130(2):269-82.
21. Stummer W, Tonn JC, Mehdorn HM, Nestler U, Franz K, Goetz C, et al. Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study. Clinical article. *J Neurosurg*. 2011;114(3):613-23.
22. Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):997-1003.
23. Cabrera AR, Kirkpatrick JP, Fiveash JB, Shih HA, Koay EJ, Lutz S, et al. Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Pract Radiat Oncol*. 2016;6(4):217-25.
24. Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol*. 2004;22(9):1583-8.
25. Wick A, Kessler T, Elia AEH, Winkler F, Batchelor TT, Platten M, Wick W. Glioblastoma in elderly patients: solid conclusions built on shifting sand? *Neuro Oncol*. 2018;20(2):174-83.
26. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med*. 2007;356(15):1527-35.
27. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated

radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):916-26.

28. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017;376(11):1027-37.

29. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003.

30. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):709-22.

31. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):699-708.

32. Jungk C, Chatziaslanidou D, Ahmadi R, Capper D, Bermejo JL, Exner J, et al. Chemotherapy with BCNU in recurrent glioma: Analysis of clinical outcome and side effects in chemotherapy-naïve patients. *BMC Cancer.* 2016;16:81.

33. Weller M, Tabatabai G, Kastner B, Felsberg J, Steinbach JP, Wick A, et al. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin Cancer Res.* 2015;21(9):2057-64.

34. Schmidt F, Fischer J, Herrlinger U, Dietz K, Dichgans J, Weller M. PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. *Neurology.* 2006;66(4):587-9.

35. Carvalho BF, Fernandes AC, Almeida DS, Sampaio LV, Costa A, Caeiro C, et al. Second-Line Chemotherapy in Recurrent Glioblastoma: A 2-Cohort Study. *Oncol Res Treat.* 2015;38(7-8):348-54.

36. Tan AC, Ashley DM, Lopez GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(4):299-312.
37. Taphoorn MJB, Dirven L, Kanner AA, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Taillibert S, et al. Influence of Treatment With Tumor-Treating Fields on Health-Related Quality of Life of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2018;4(4):495-504.
38. Cloughesy TF, Lassman AB. NovoTTF: where to go from here? *Neuro Oncol.* 2017;19(5):605-8.
39. Hottinger AF, Pacheco P, Stupp R. Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors. *Neuro Oncol.* 2016;18(10):1338-49.
40. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer.* 2012;48(14):2192-202.
41. Bradley S, Sherwood PR, Donovan HS, Hamilton R, Rosenzweig M, Hricik A, et al. I could lose everything: understanding the cost of a brain tumor. *J Neurooncol.* 2007;85(3):329-38.
42. Sizoo EM, Braam L, Postma TJ, Pasman HR, Heimans JJ, Klein M, et al. Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients. *Neuro Oncol.* 2010;12(11):1162-6.
43. Glantz MJ, Cole BF, Forsyth PA, Recht LD, Wen PY, Chamberlain MC, et al. Practice parameter: anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2000;54(10):1886-93.
44. Usury JB, Michael LM, 2nd, Sills AK, Finch CK. A prospective evaluation and literature review of levetiracetam use in patients with brain tumors and seizures. *J Neurooncol.* 2010;99(2):251-60.

45. Benit CP, Vecht CJ. Seizures and cancer: drug interactions of anticonvulsants with chemotherapeutic agents, tyrosine kinase inhibitors and glucocorticoids. *Neurooncol Pract.* 2016;3(4):245-60.
46. van Breemen MS, Rijsman RM, Taphoorn MJ, Walchenbach R, Zwinkels H, Vecht CJ. Efficacy of anti-epileptic drugs in patients with gliomas and seizures. *J Neurol.* 2009;256(9):1519-26.
47. Perry JR. Thromboembolic disease in patients with high-grade glioma. *Neuro Oncol.* 2012;14 Suppl 4(Suppl 4):iv73-80.
48. Pitter KL, Tamagno I, Alikhanyan K, Hosni-Ahmed A, Pattwell SS, Donnola S, et al. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma. *Brain.* 2016;139(Pt 5):1458-71.
49. Schiff D, Lee EQ, Nayak L, Norden AD, Reardon DA, Wen PY. Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment. *Neuro Oncol.* 2015;17(4):488-504.
50. Pace A, Dirven L, Koekkoek JAF, Golla H, Fleming J, Ruda R, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guidelines for palliative care in adults with glioma. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):e330-e40.
51. Lyman GH, Bohlke K, Falanga A, American Society of Clinical O. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Oncol Pract.* 2015;11(3):e442-4.
52. Krenzlin H, Lorenz V, Alessandri B. The involvement of thrombin in the pathogenesis of glioblastoma. *J Neurosci Res.* 2017;95(10):2080-5.
53. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol.* 2002;20(5):1375-82.
54. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg.* 1991;61(5):340-8.

55. Stepp H, Stummer W. 5-ALA in the management of malignant glioma. *Lasers Surg Med.* 2018;50(5):399-419.
56. Akimoto J. Photodynamic Therapy for Malignant Brain Tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2016;56(4):151-7.
57. Reznik E, Smith AW, Taube S, Mann J, Yondorf MZ, Parashar B, Wernicke AG. Radiation and Immunotherapy in High-grade Gliomas: Where Do We Stand? *Am J Clin Oncol.* 2018;41(2):197-212.
58. Sun J, Guo M, Pang H, Qi J, Zhang J, Ge Y. Treatment of malignant glioma using hyperthermia. *Neural Regen Res.* 2013;8(29):2775-82.
59. Lee Titworth W, Murad GJ, Hoh BL, Rahman M. Fighting fire with fire: the revival of thermotherapy for gliomas. *Anticancer Res.* 2014;34(2):565-74.
60. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004;1(4):279-93.
61. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(1):1-23.
62. Kessel D. Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol.* 2019;95(1):119-25.
63. Hirschberg H, Sun CH, Tromberg BJ, Yeh AT, Madsen SJ. Enhanced cytotoxic effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy by concurrent hyperthermia in glioma spheroids. *J Neurooncol.* 2004;70(3):289-99.
64. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel).* 2011;3(2):2516-39.
65. Cengel KA, Simone CB, Busch TM. *Vascular Effects of Photodynamic Therapy for Tumors: World Scientific; 2016.*

66. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(7):535-45.
67. Bechet D, Mordon SR, Guillemin F, Barberi-Heyob MA. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: a complementary approach to conventional therapies. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(2):229-41.
68. Quirk BJ, Brandal G, Donlon S, Vera JC, Mang TS, Foy AB, et al. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand? *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(3):530-44.
69. Yang X, Li W, Palasuberniam P, Myers KA, Wang C, Chen B. Effects of Silencing Heme Biosynthesis Enzymes on 5-Aminolevulinic Acid-mediated Protoporphyrin IX Fluorescence and Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*. 2015;91(4):923-30.
70. Teng L, Nakada M, Zhao SG, Endo Y, Furuyama N, Nambu E, et al. Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. *Br J Cancer*. 2011;104(5):798-807.
71. Traylor JI, Pernik MN, Sternisha AC, McBrayer SK, Abdullah KG. Molecular and Metabolic Mechanisms Underlying Selective 5-Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence in Gliomas. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3).
72. Valdes PA, Bekelis K, Harris BT, Wilson BC, Leblond F, Kim A, et al. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in meningioma: qualitative and quantitative measurements in vivo. *Neurosurgery*. 2014;10 Suppl 1(0 1):74-82; discussion -3.
73. Hadjipanayis CG, Widhalm G, Stummer W. What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant Gliomas? *Neurosurgery*. 2015;77(5):663-73.
74. Beck TJ, Kreth FW, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Stepp H, et al. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg Med*. 2007;39(5):386-93.

75. Tetard MC, Vermandel M, Mordon S, Lejeune JP, Reyns N. Experimental use of photodynamic therapy in high grade gliomas: a review focused on 5-aminolevulinic acid. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014;11(3):319-30.
76. Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, Wallace VP, Hirschberg H. Photodynamic therapy of human glioma spheroids using 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol*. 2000;72(1):128-34.
77. Hirschberg H, Sun CH, Krasieva T, Madsen SJ. Effects of ALA-mediated photodynamic therapy on the invasiveness of human glioma cells. *Lasers Surg Med*. 2006;38(10):939-45.
78. Mathews MS, Angell-Petersen E, Sanchez R, Sun CH, Vo V, Hirschberg H, Madsen SJ. The effects of ultra low fluence rate single and repetitive photodynamic therapy on glioma spheroids. *Lasers Surg Med*. 2009;41(8):578-84.
79. Singh G, Alqawi O, Espiritu M. Metronomic PDT and cell death pathways. *Methods Mol Biol*. 2010;635:65-78.
80. Lou X, Kim G, Yoon HK, Lee YE, Kopelman R, Yoon E. A high-throughput photodynamic therapy screening platform with on-chip control of multiple microenvironmental factors. *Lab Chip*. 2014;14(5):892-901.
81. Hefti M, Albert I, Luginbuehl V. Phenytoin reduces 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in malignant glioma cells. *J Neurooncol*. 2012;108(3):443-50.
82. Lawrence JE, Steele CJ, Rovin RA, Belton RJ, Jr., Winn RJ. Dexamethasone alone and in combination with desipramine, phenytoin, valproic acid or levetiracetam interferes with 5-ALA-mediated PpIX production and cellular retention in glioblastoma cells. *J Neurooncol*. 2016;127(1):15-21.
83. Shi L, Buchner A, Pohla H, Pongratz T, Ruhm A, Zimmermann W, et al. Methadone enhances the effectiveness of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for squamous cell carcinoma and glioblastoma in vitro. *J Biophotonics*. 2019;12(10):e201800468.

84. Zhao SG, Chen XF, Wang LG, Yang G, Han DY, Teng L, et al. Increased expression of ABCB6 enhances protoporphyrin IX accumulation and photodynamic effect in human glioma. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(13):4379-88.
85. Sun W, Kajimoto Y, Inoue H, Miyatake S, Ishikawa T, Kuroiwa T. Gefitinib enhances the efficacy of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in malignant brain tumor cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013;10(1):42-50.
86. Kawai N, Hirohashi Y, Ebihara Y, Saito T, Murai A, Saito T, et al. ABCG2 expression is related to low 5-ALA photodynamic diagnosis (PDD) efficacy and cancer stem cell phenotype, and suppression of ABCG2 improves the efficacy of PDD. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216503.
87. Muller P, Abdel Gaber SA, Zimmermann W, Wittig R, Stepp H. ABCG2 influence on the efficiency of photodynamic therapy in glioblastoma cells. *J Photochem Photobiol B*. 2020;210:111963.
88. Mansi M, Howley R, Chandratre S, Chen B. Inhibition of ABCG2 transporter by lapatinib enhances 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX fluorescence and photodynamic therapy response in human glioma cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2022;200:115031.
89. Albert I, Hefti M, Luginbuehl V. Physiological oxygen concentration alters glioma cell malignancy and responsiveness to photodynamic therapy in vitro. *Neurol Res*. 2014;36(11):1001-10.
90. Fahey JM, Emmer JV, Korytowski W, Hogg N, Girotti AW. Antagonistic Effects of Endogenous Nitric Oxide in a Glioblastoma Photodynamic Therapy Model. *Photochem Photobiol*. 2016;92(6):842-53.
91. Schimanski A, Ebbert L, Sabel MC, Finocchiaro G, Lamszus K, Ewelt C, et al. Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment. *J Photochem Photobiol B*. 2016;163:203-10.

92. Wang W, Tabu K, Hagiya Y, Sugiyama Y, Kokubu Y, Murota Y, et al. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. *Sci Rep*. 2017;7:42070.
93. Fujishiro T, Nonoguchi N, Pavliukov M, Ohmura N, Kawabata S, Park Y, et al. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target human glioma stem-like cells refractory to antineoplastic agents. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;24:58-68.
94. Ihata T, Nonoguchi N, Fujishiro T, Omura N, Kawabata S, Kajimoto Y, Wanibuchi M. The effect of hypoxia on photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in malignant gliomas. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022;40:103056.
95. Vilchez ML, Rodriguez LB, Palacios RE, Pucca CG, Caverzan MD, Caputto BL, et al. Isolation and initial characterization of human glioblastoma cells resistant to photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021;33:102097.
96. Pedrosa L, Bedia C, Diao D, Mosteiro A, Ferres A, Stanzani E, et al. Preclinical Studies with Glioblastoma Brain Organoid Co-Cultures Show Efficient 5-ALA Photodynamic Therapy. *Cells*. 2023;12(8).
97. Moriyama EH, Bisland SK, Lilge L, Wilson BC. Bioluminescence imaging of the response of rat gliosarcoma to ALA-PpIX-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2004;80(2):242-9.
98. Madsen SJ, Angell-Petersen E, Spetalen S, Carper SW, Ziegler SA, Hirschberg H. Photodynamic therapy of newly implanted glioma cells in the rat brain. *Lasers Surg Med*. 2006;38(5):540-8.
99. Zhang C, Feng W, Li Y, Kurths J, Yu T, Semyachkina-Glushkovskaya O, Zhu D. Age differences in photodynamic therapy-mediated opening of the blood-brain barrier through the optical clearing skull window in mice. *Lasers Surg Med*. 2019;51(7):625-33.
100. Teh DBL, Bansal A, Chai C, Toh TB, Tucker RAJ, Gammad GGL, et al. A Flexi-PEGDA Upconversion Implant for Wireless Brain Photodynamic Therapy. *Adv Mater*. 2020;32(29):e2001459.

101. Angell-Petersen E, Spetalen S, Madsen SJ, Sun CH, Peng Q, Carper SW, et al. Influence of light fluence rate on the effects of photodynamic therapy in an orthotopic rat glioma model. *J Neurosurg.* 2006;104(1):109-17.
102. Hirschberg H, Spetalen S, Carper S, Hole P, Tillung T, Madsen S. Minimally invasive photodynamic therapy (PDT) for ablation of experimental rat glioma. *Minim Invasive Neurosurg.* 2006;49(3):135-42.
103. Guo HW, Lin LT, Chen PH, Ho MH, Huang WT, Lee YJ, et al. Low-fluence rate, long duration photodynamic therapy in glioma mouse model using organic light emitting diode (OLED). *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(3):504-10.
104. Tetard MC, Vermandel M, Leroy HA, Leroux B, Maurage CA, Lejeune JP, et al. Interstitial 5-ALA photodynamic therapy and glioblastoma: Preclinical model development and preliminary results. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;13:218-24.
105. Leroy HA, Vermandel M, Vignion-Dewalle AS, Leroux B, Maurage CA, Duhamel A, et al. Interstitial photodynamic therapy and glioblastoma: Light fractionation in a preclinical model. *Lasers Surg Med.* 2017;49(5):506-15.
106. Vermandel M, Quidet M, Vignion-Dewalle AS, Leroy HA, Leroux B, Mordon S, Reyns N. Comparison of different treatment schemes in 5-ALA interstitial photodynamic therapy for high-grade glioma in a preclinical model: An MRI study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25:166-76.
107. Ito S, Rachinger W, Stepp H, Reulen HJ, Stummer W. Oedema formation in experimental photo-irradiation therapy of brain tumours using 5-ALA. *Acta Neurochir (Wien).* 2005;147(1):57-65.
108. Mathews MS, Chighvinadze D, Gach HM, Uzal FA, Madsen SJ, Hirschberg H. Cerebral edema following photodynamic therapy using endogenous and exogenous photosensitizers in normal brain. *Lasers Surg Med.* 2011;43(9):892-900.
109. Yi W, Xu HT, Tian DF, Wu LQ, Zhang SQ, Wang L, et al. Photodynamic therapy mediated by 5-aminolevulinic acid suppresses gliomas growth by decreasing the microvessels. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2015;35(2):259-64.

110. Kimura S, Kuroiwa T, Ikeda N, Nonoguchi N, Kawabata S, Kajimoto Y, Ishikawa T. Assessment of safety of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in rat brain. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;21:367-74.
111. Fisher CJ, Niu C, Foltz W, Chen Y, Sidorova-Darmos E, Eubanks JH, Lilge L. ALA-PpIX mediated photodynamic therapy of malignant gliomas augmented by hypothermia. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181654.
112. Park J, Kong C, Shin J, Park JY, Na YC, Han SH, et al. Combined Effects of Focused Ultrasound and Photodynamic Treatment for Malignant Brain Tumors Using C6 Glioma Rat Model. *Yonsei Med J*. 2023;64(4):233-42.
113. Eljamel MS, Goodman C, Moseley H. ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial. *Lasers Med Sci*. 2008;23(4):361-7.
114. Stummer W, Beck T, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Etminan N, et al. Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report. *J Neurooncol*. 2008;87(1):103-9.
115. Hennig G, Stepp H, Johansson A. Photobleaching-based method to individualize irradiation time during interstitial 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2011;8(3):275-81.
116. Johansson A, Faber F, Kniebuhler G, Stepp H, Sroka R, Egensperger R, et al. Protoporphyrin IX fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis. *Lasers Surg Med*. 2013;45(4):225-34.
117. Schipmann S, Muther M, Stogbauer L, Zimmer S, Brokinkel B, Holling M, et al. Combination of ALA-induced fluorescence-guided resection and intraoperative open photodynamic therapy for recurrent glioblastoma: case series on a promising dual strategy for local tumor control. *J Neurosurg*. 2020;134(2):426-36.
118. Vermandel M, Dupont C, Lecomte F, Leroy HA, Tuleasca C, Mordon S, et al. Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed

glioblastoma patients: a preliminary analysis of the INDYGO clinical trial. *J Neurooncol.* 2021;152(3):501-14.

119. Leroy HA, Guerin L, Lecomte F, Baert G, Vignion AS, Mordon S, Reyns N. Is interstitial photodynamic therapy for brain tumors ready for clinical practice? A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;36:102492.

120. Lietke S, Schmutzer M, Schwartz C, Weller J, Siller S, Aumiller M, et al. Interstitial Photodynamic Therapy Using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences. *Cancers (Basel).* 2021;13(8).

121. Foglar M, Aumiller M, Bochmann K, Buchner A, El Fahim M, Quach S, et al. Interstitial Photodynamic Therapy of Glioblastomas: A Long-Term Follow-up Analysis of Survival and Volumetric MRI Data. *Cancers (Basel).* 2023;15(9).

122. Kozlikina EI, Trifonov IS, Sinkin MV, Krylov VV, Loschenov VB. The Combined Use of 5-ALA and Chlorin e6 Photosensitizers for Fluorescence-Guided Resection and Photodynamic Therapy under Neurophysiological Control for Recurrent Glioblastoma in the Functional Motor Area after Ineffective Use of 5-ALA: Preliminary Results. *Bioengineering (Basel).* 2022;9(3).