



IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos



TERAPIA FOTODINÂMICA

Cristina Kurachi
Laboratório de Biofotônica

Instituto de Física de São Carlos



Modelos 3D

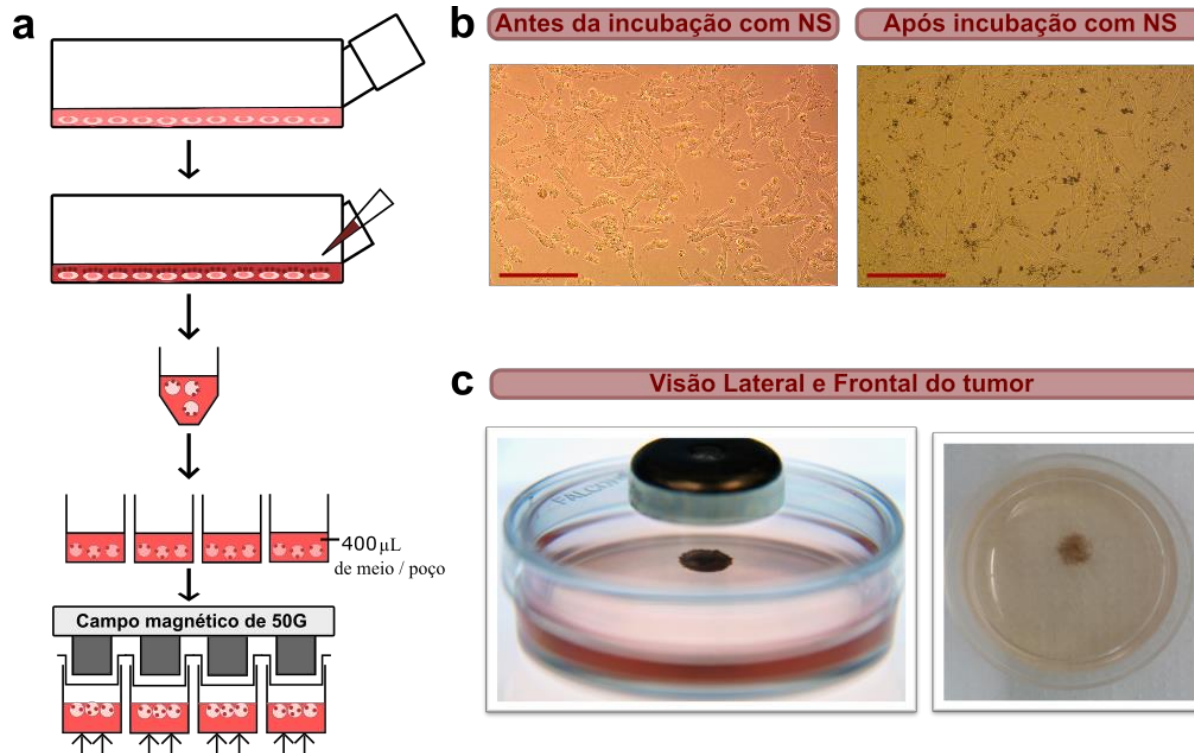


Figura 10 – Representação esquemática do Método de levitação magnética. a) Nanopartículas ferromagnéticas (NS) são adicionadas em garrafas de 25cm² com células de melanoma em 80% de confluência e incubadas *overnight* (16 horas). No dia seguinte, as células são desprendidas com tripsina e ressuspensas em meio de cultura McCoy, resultando em 400 µL por poço, para o caso de placas de 24 poços. As células então levitam na interface ar – meio ao se colocar ímã de neodímio sobre a placa multipoços. b) Células de melanoma (G361) antes e após incubação com NS. Há permanência da morfologia celular aderente mesmo com adição de nanopartículas. Escala 200µm. c) Esquema de uma placa de Petri com ímã e visão de um tumor de melanoma.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 15 – Método de impressão celular magnética. Após 24h de levitação, o tumor de melanoma é “quebrado” por dissociação mecânica e centrifugado. Após ressuspensão as células e matriz extracelular são igualmente distribuídas em placas de 96 poços (1×10^5 células por poço). Por fim, o arranjo de ímãs é colocado abaixo da placa e os esferoides são formados com 1 hora de levitação. Escala: $200 \mu\text{m}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

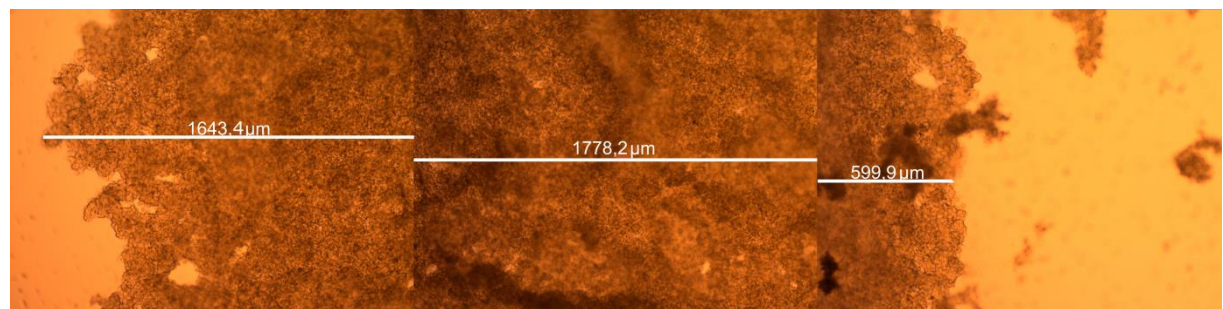


Figura 18 – Tumor de melanoma após 24 horas de levitação, em placa de 6 poços. Imagens do tumor foram tiradas em trechos, dado o seu grande tamanho. O diâmetro aproximado da cultura formada foi de 4mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

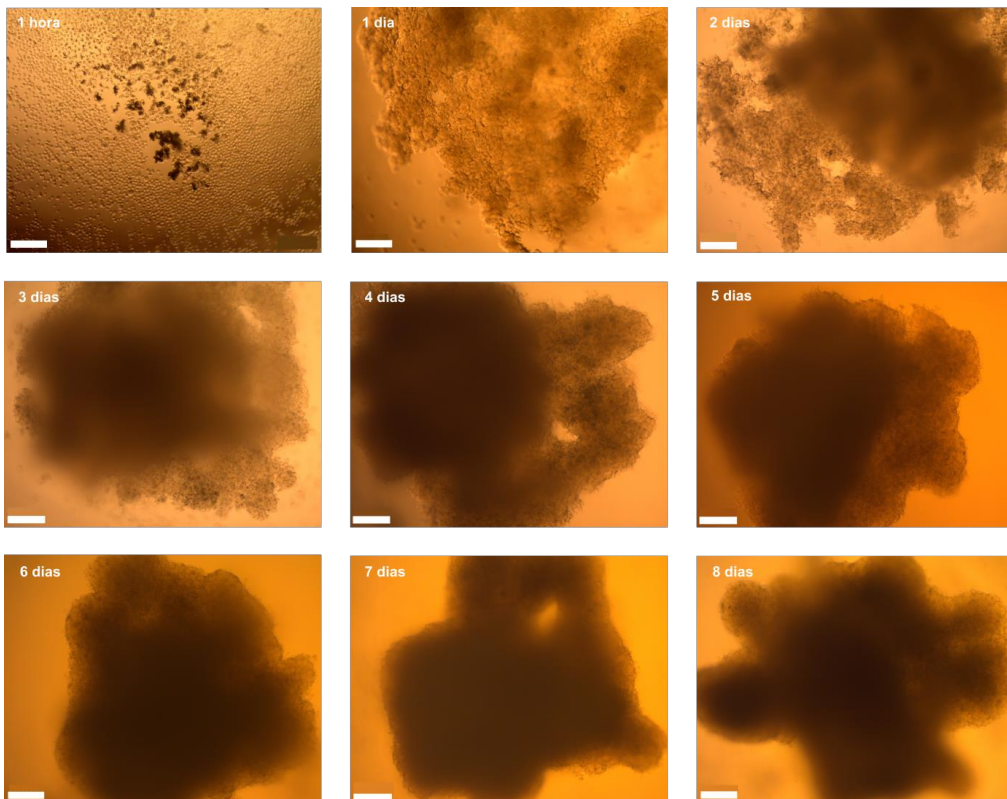


Figura 19 – Culturas tridimensionais de melanoma humano em função do tempo de levitação. Imagens em microscopia dos tumores em placa de 24 poços. Escala: 200 µm.

Fonte: Elaborada pela autora.

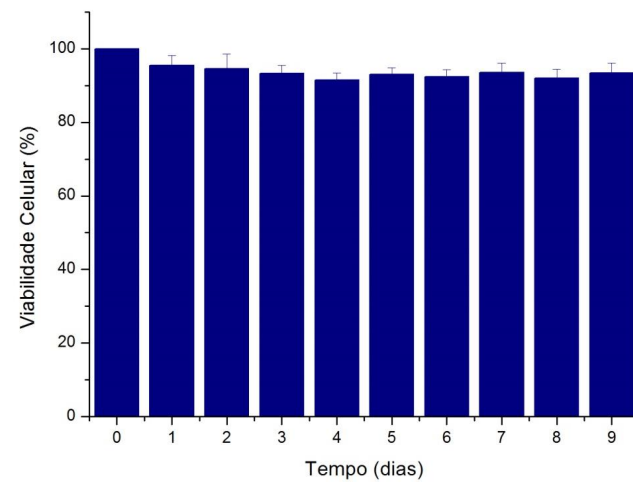


Figura 20 – Viabilidade celular dos tumores de melanoma ao longo dos dias de levitação.

Fonte: Elaborada pela autora.

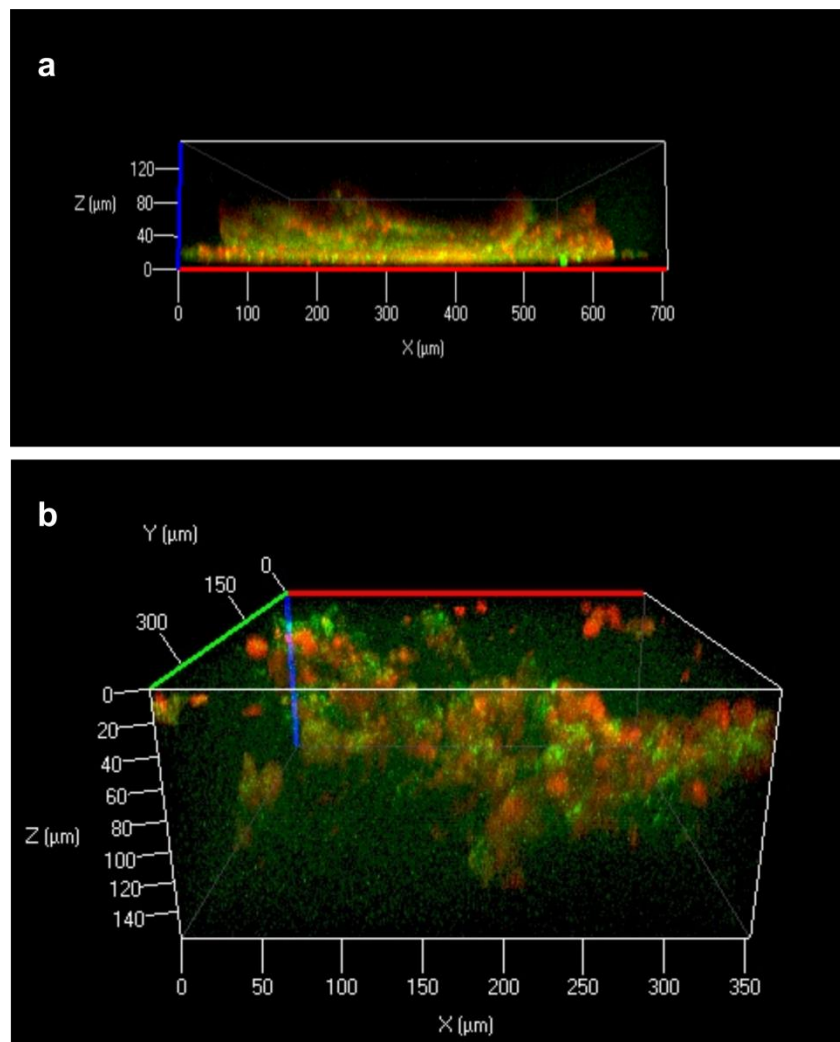
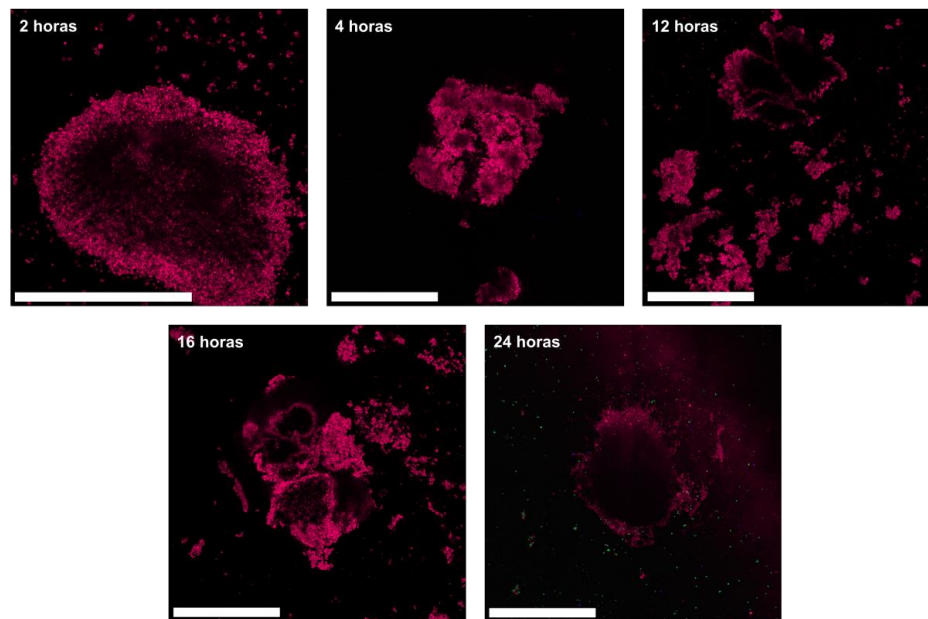


Figura 21 – Imagens em microscopia confocal de fluorescência dos tumores de melanoma. a) Os esferoides obtiveram espessura aproximada de 80 μm devido ao arranjo de imãs abaixo da placa de 96 poços durante a impressão magnética, conferindo um maior “achatamento” do tumor. Os magnetos podem ser retirados após a formação dos esferoides sem perda da estrutura. b) Os tumores em placas de 24 poços adquiriram espessura entre 120 a 130 μm . Isso ocorreu porque o arranjo de imãs, nesse caso, ficou acima da placa de cultivo, permitindo maiores graus de liberdade e interações em diferentes planos das células de melanoma.

Fonte: Elaborada pela autora.

Photodithazine



Photogem

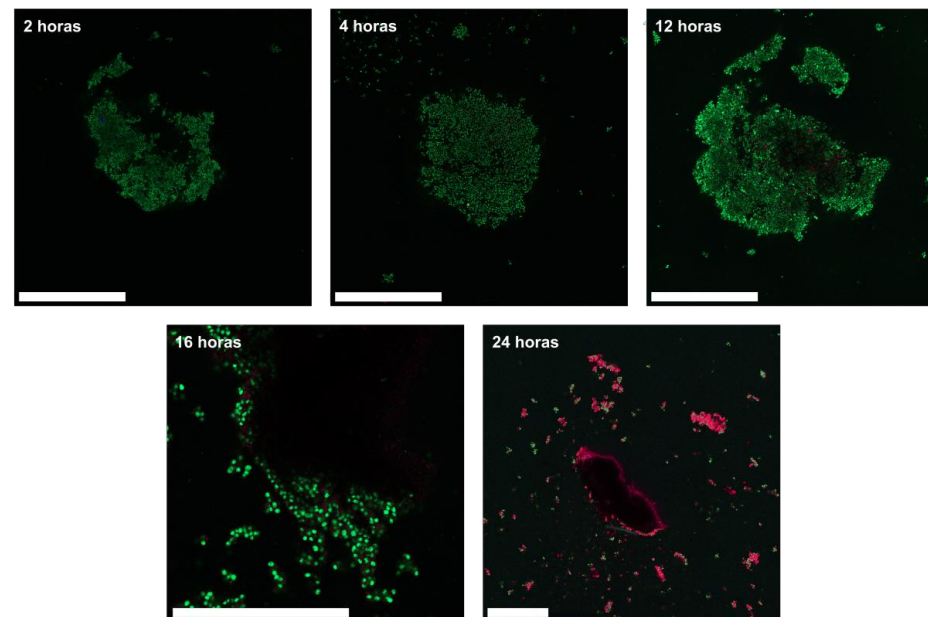


Figura 30 – Imagens espectrais, com aumento de 20 vezes, de tumores de melanoma incubados com Photodithazine® e Photogem®, em diferentes tempos. Escala: 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

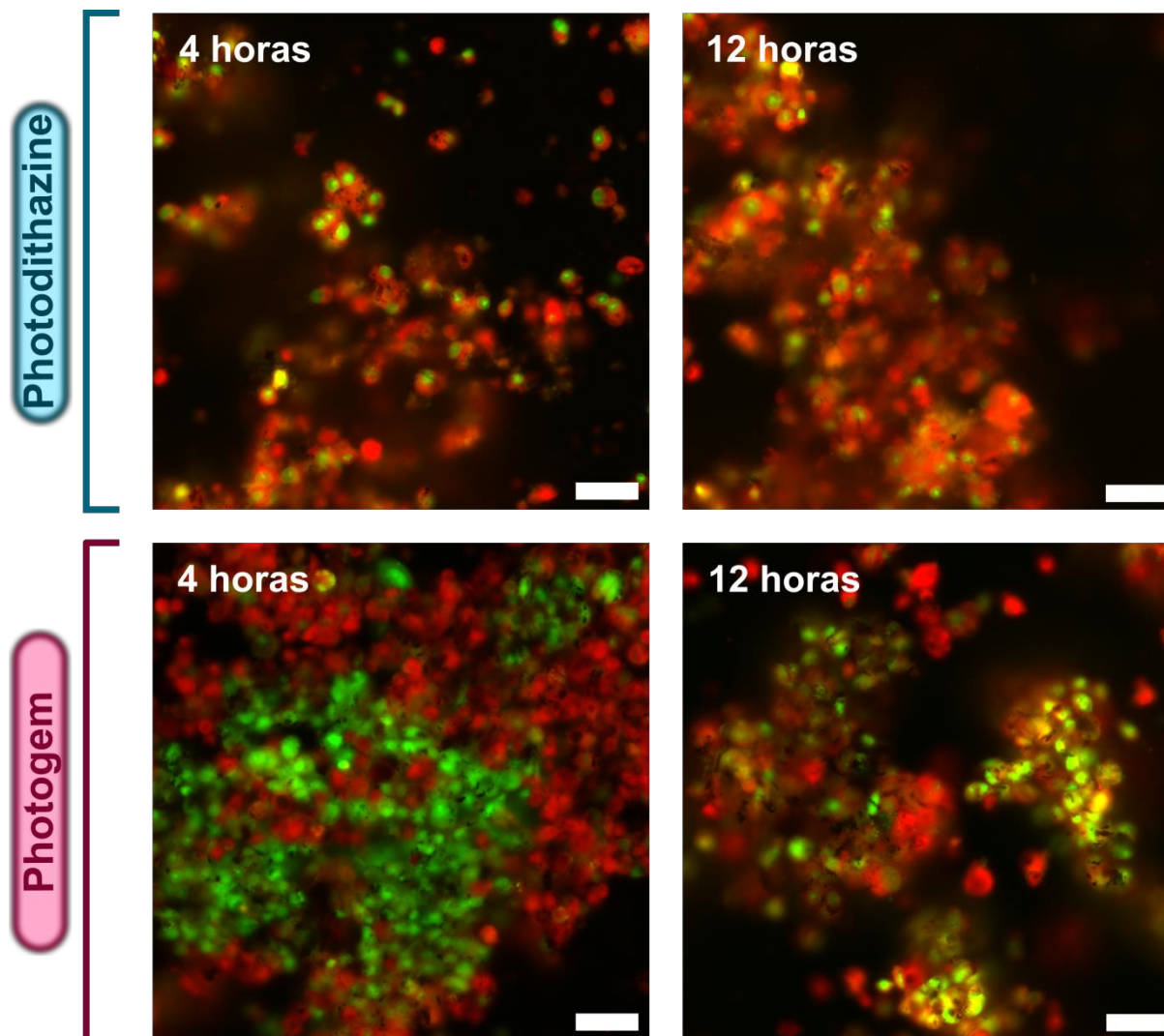


Figura 31 – Imagens de fluorescência em microscopia confocal de tumores de melanoma imersos em solução de PDZ e Photogem®, ambos na concentração de 50 µg/mL. Destaque para a distribuição homogênea do PDZ nas culturas em detrimento da heterogênea para o Photogem®. As imagens foram obtidas com aumento de 40 vezes e a escala refere-se à 50 µm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6 – Resultados da quantificação de fotossensibilizadores intracelulares em culturas de melanoma humano em monocamada.

Fotossensibilizador	Tempo de incubação (horas)	Concentração de FS intracelular (µg/mL)
Photodithazine[®]	4	(3,00 ± 0,05)
	8	(3,24 ± 0,05)
	16	(5,70 ± 0,11)
	24	(3,45 ± 0,06)
Photogem[®]	4	(1,52 ± 0,05)
	8	(2,71 ± 0,50)
	16	(3,25 ± 0,59)
	24	(6,14 ± 0,82)

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 – Resultados da quantificação de fotossensibilizadores intracelulares em culturas tridimensionais de melanoma humano.

Fotossensibilizador	Tempo de incubação (horas)	Concentração de FS intracelular (µg/mL)
Photodithazine[®]	4	(0,82 ± 0,02)
	8	(1,60 ± 0,03)
	16	(2,67 ± 0,04)
	24	(1,90 ± 0,03)
Photogem[®]	4	(0,25 ± 0,03)
	8	(0,80 ± 0,10)
	16	(1,08 ± 0,12)
	24	(1,97 ± 0,19)

Fonte: Elaborada pela autora.

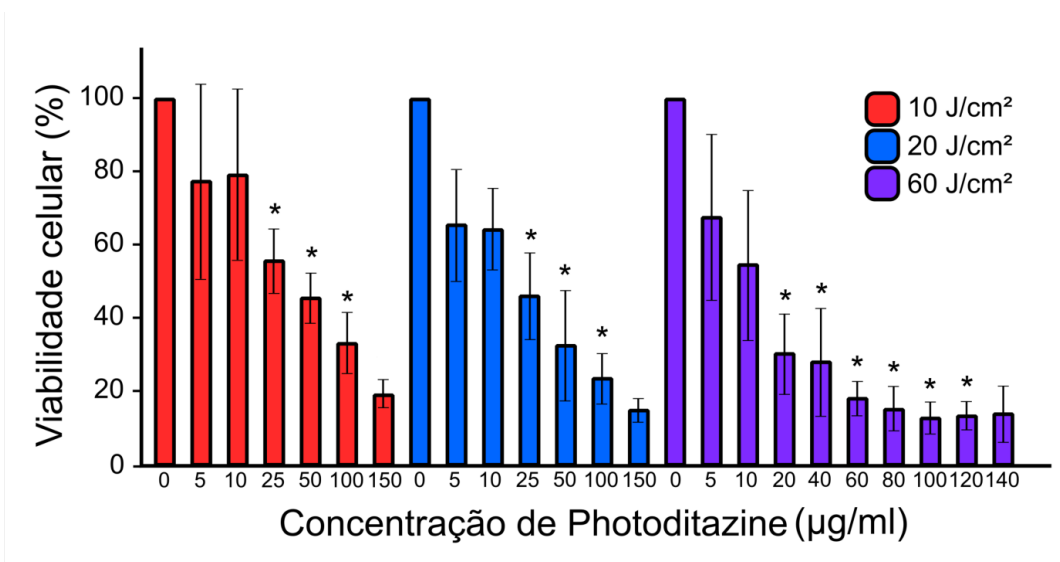


Figura 33 – Gráfico normalizado dos experimentos de TFD em tumores de 80 µm de espessura (placa de 96 poços) com diferentes doses de irradiação, através do ensaio de MTT. Cada dose de luz define um determinado tempo de iluminação, sendo em ordem crescente 7min e 58 s, 15 min e 55 s, 47 min e 45 s. Os respectivos grupos controle designados por “0”, representam as amostras tumorais não incubadas com Photodithazine®. Os grupos identificados por * se referem aos que apresentaram diferença estatística significativa ($p<0,05$), com relação aos seus respectivos grupos controle.

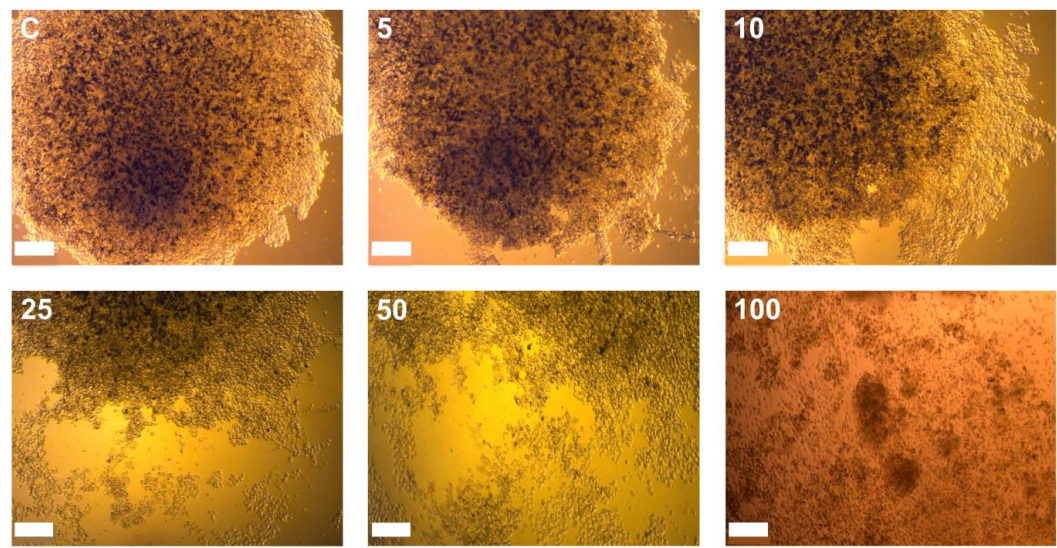


Figura 34 – Imagens em microscopia óptica dos tumores de melanoma humano (com 80 µm de espessura) após 24 horas da TFD em 20 J/cm². A letra C representa o grupo controle, enquanto os demais números as concentrações de Photodithazine® utilizadas. Escala: 200 µm.

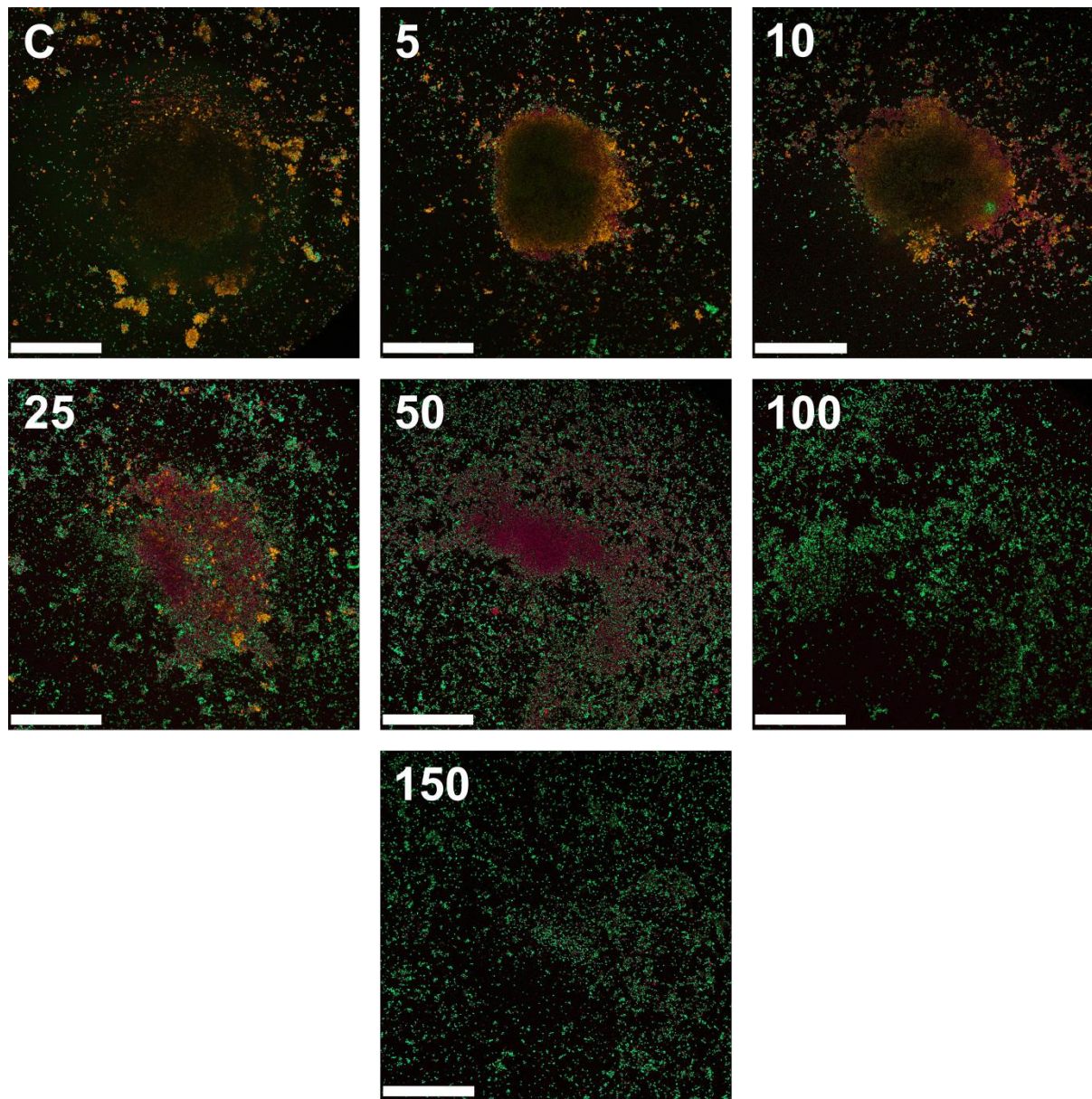


Figura 35 – Imagens em microscopia confocal da fluorescência natural de tumores de melanoma humano (com 80 μm de espessura) incubados com marcadores, após 24 horas da TFD em 20 J/cm^2 . A emissão de fluorescência em verde representa as células mortas (SYTOX[®]), enquanto em vermelho as vivas (C_{12} -resofurin). A letra C é o controle e, os outros números, as concentrações de Photodithazine[®]. Escala: 1 mm.

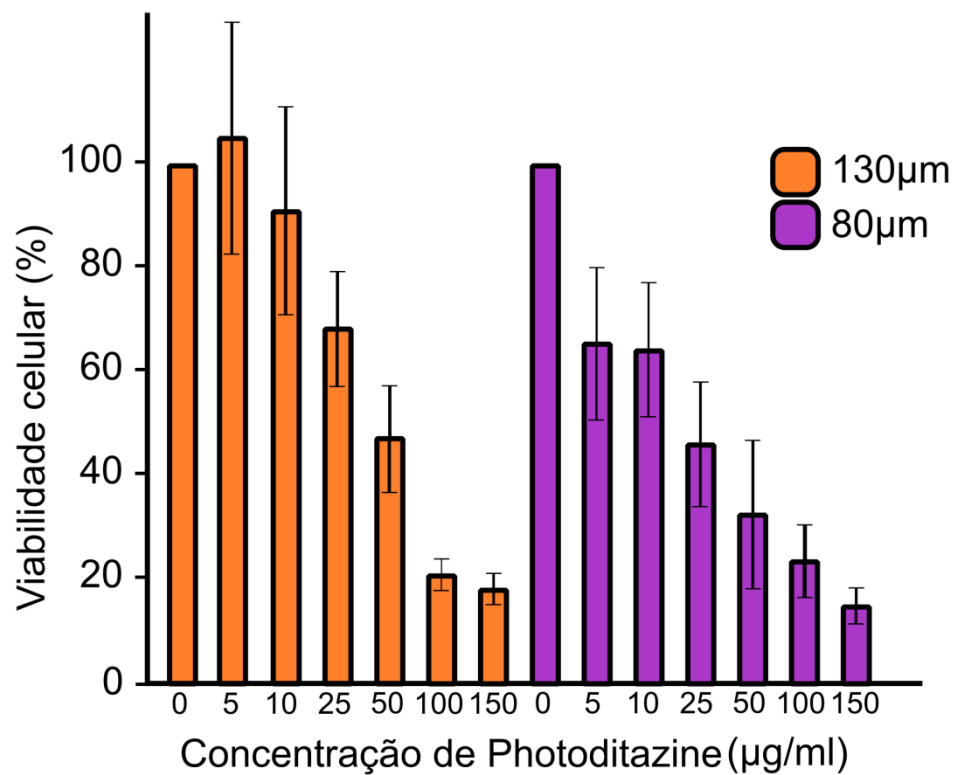
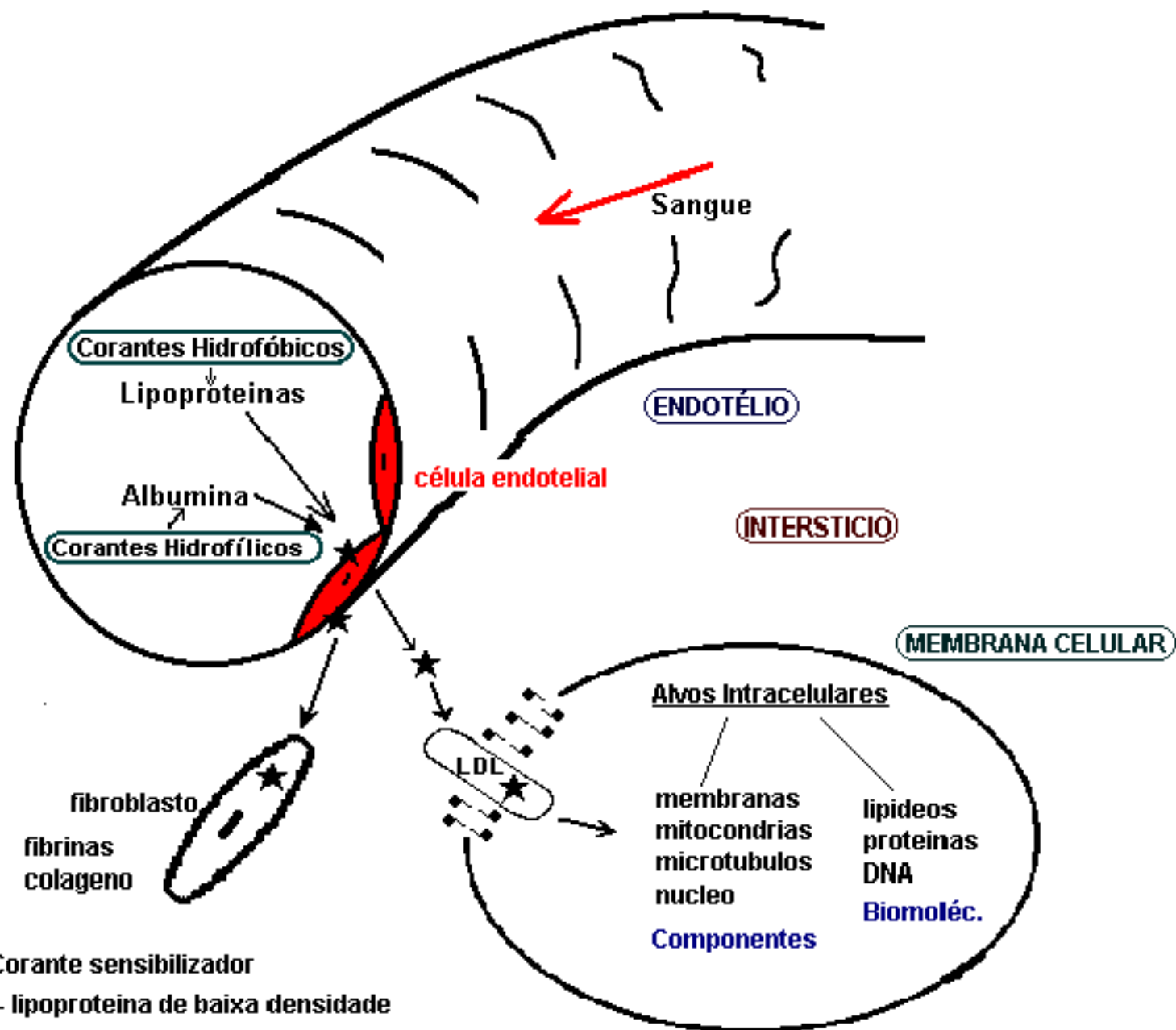


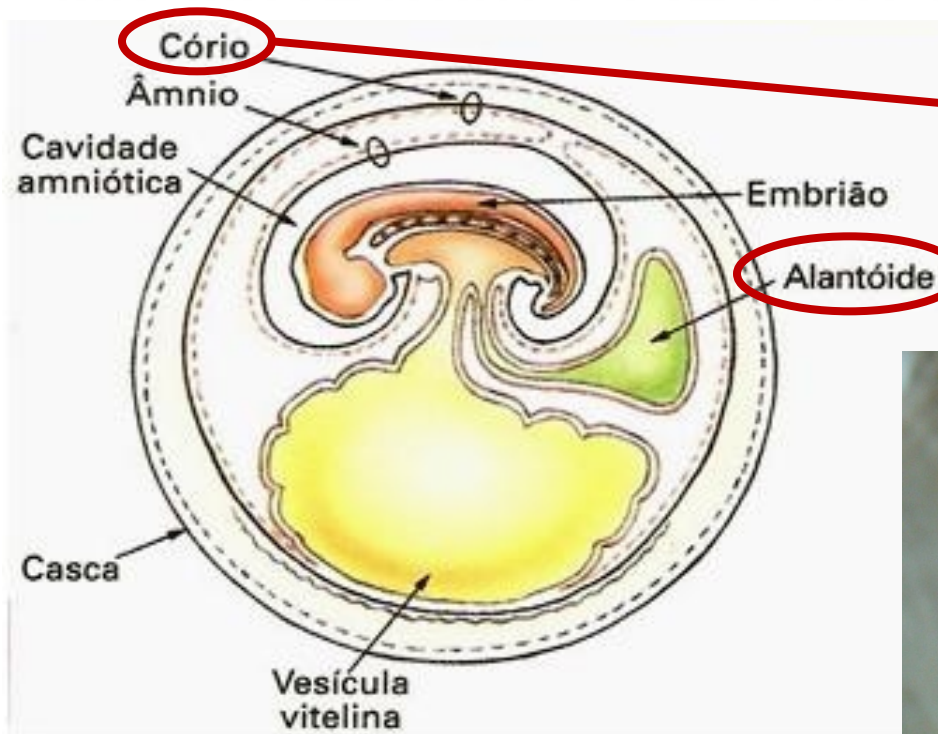
Figura 38 – Comparativo da resposta fotodinâmica em tumores de diferentes espessuras, para a mesma dose de irradiação (20 J/cm²) e intervalo de concentrações de Photodithazine[®].



★ Corante sensibilizador

LDL - lipoproteína de baixa densidade

MEMBRANA CORIOALANTÓICA



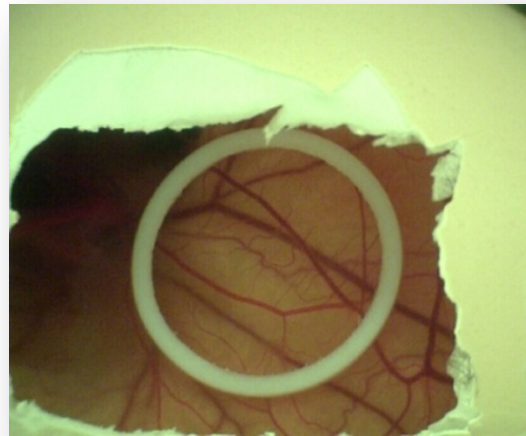
Trocas gasosas



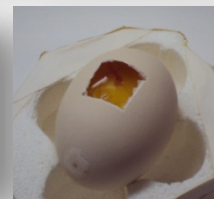
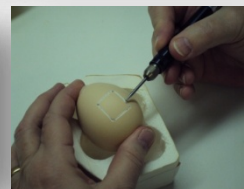
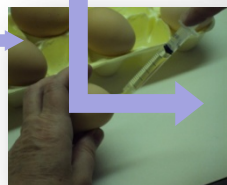
COMO OBTER O MODELO DE CAM

Dias de desenvolvimento do embrião

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	...	21
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	-----	----



Vasos sanguíneos em tamanho ideal e sem dor



AQUISIÇÃO DE IMAGENS



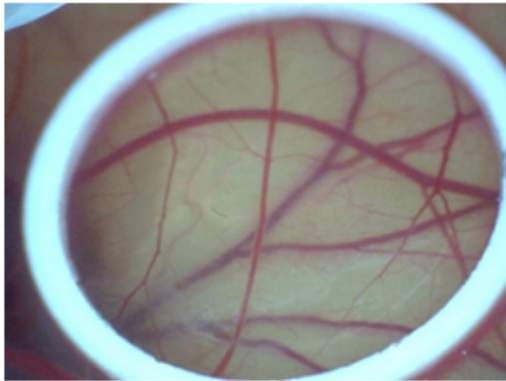
USB Digital Microscope®
(AVANTGARDE, China)

Imagem a cada 30 minutos

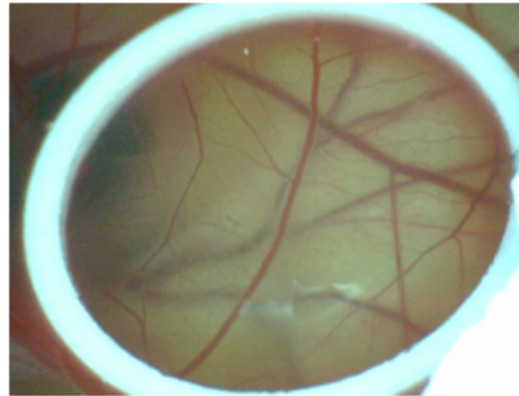


PORFIRINA

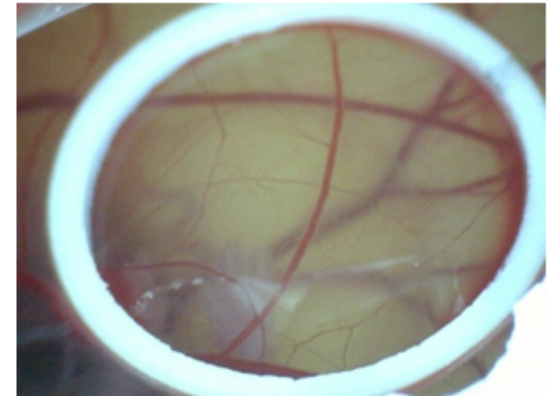
$1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$



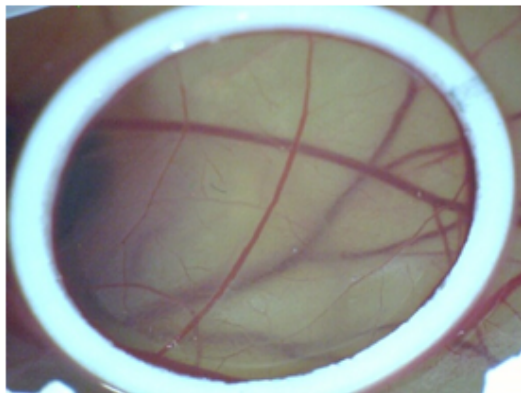
0min



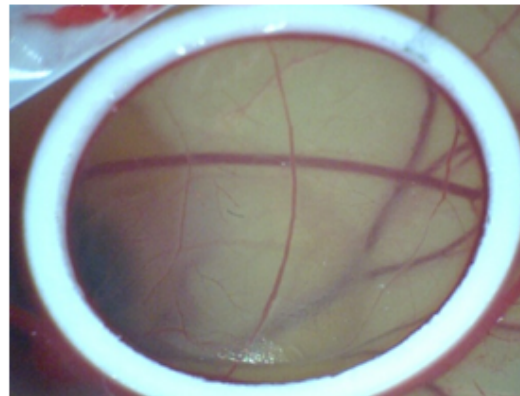
30min



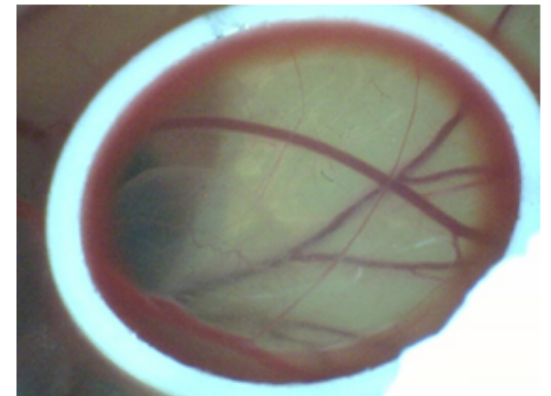
90min



150min



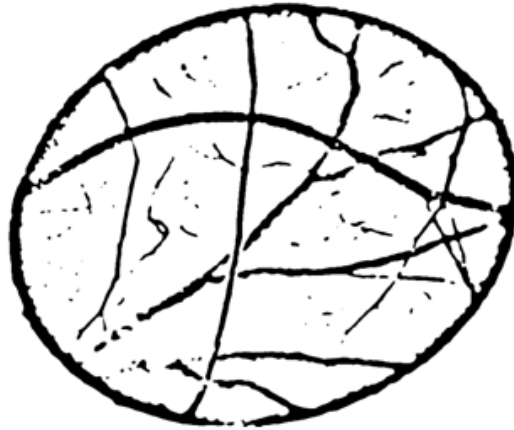
240min



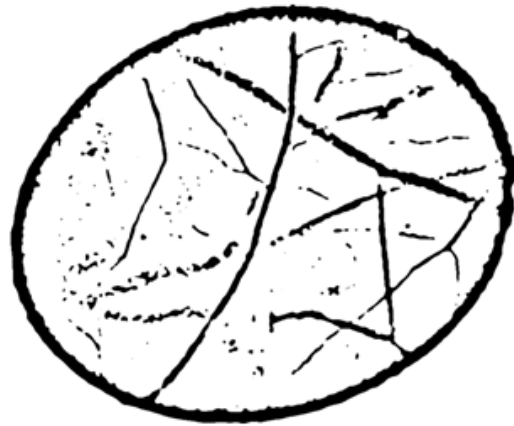
300min

PORFIRINA

$1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$



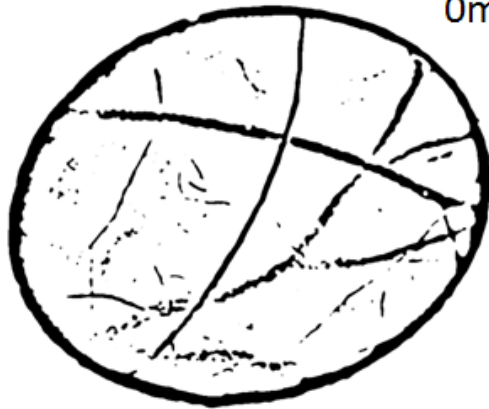
0min



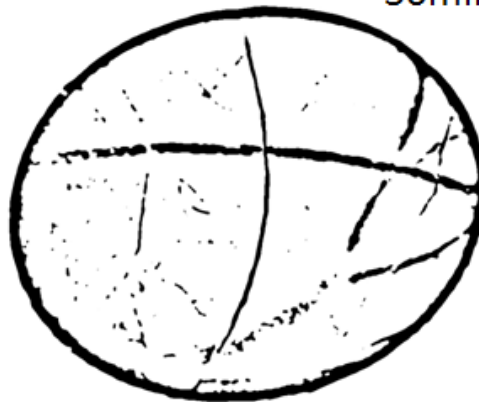
30min



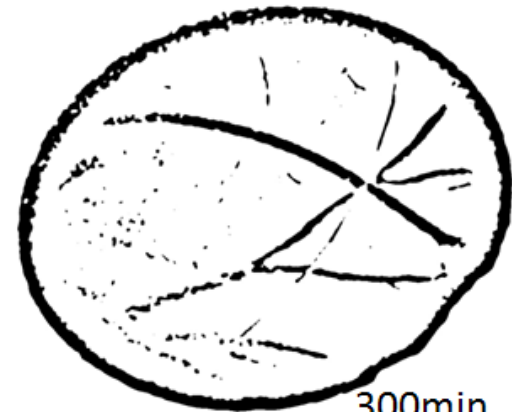
90min



150min



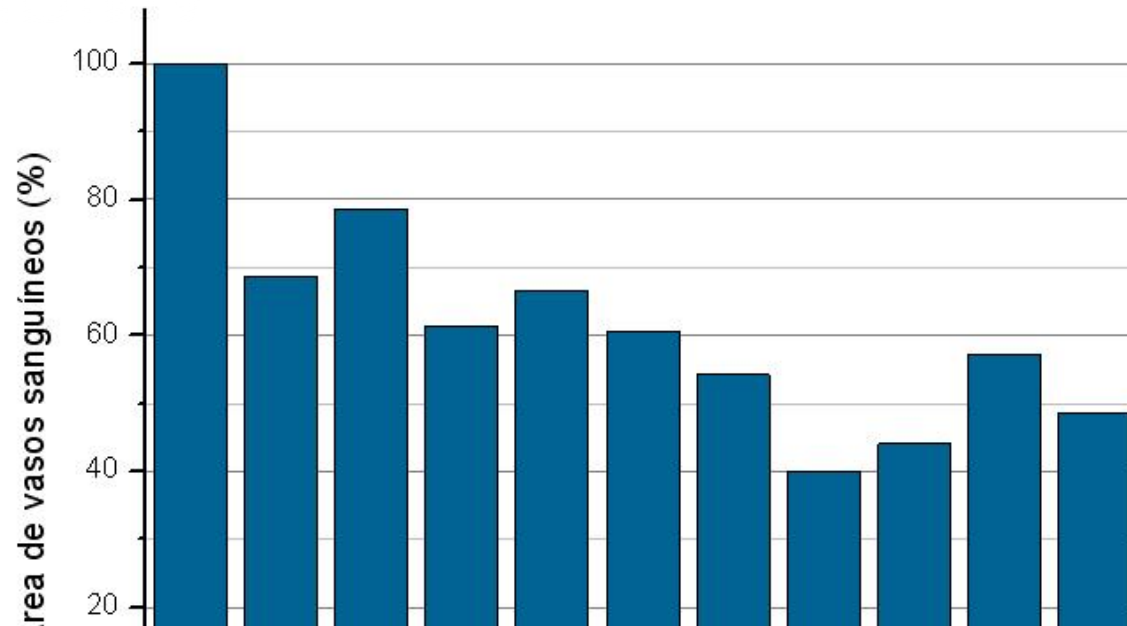
240min



300min

PORFIRINA

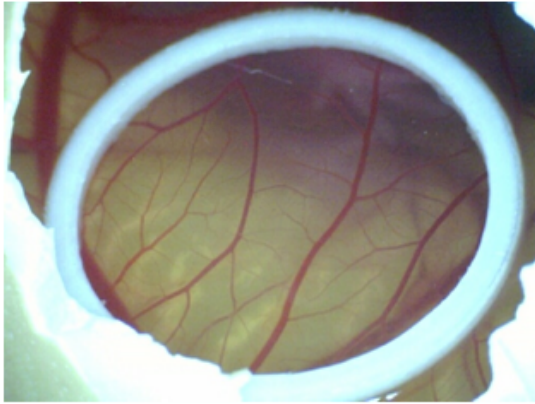
1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$



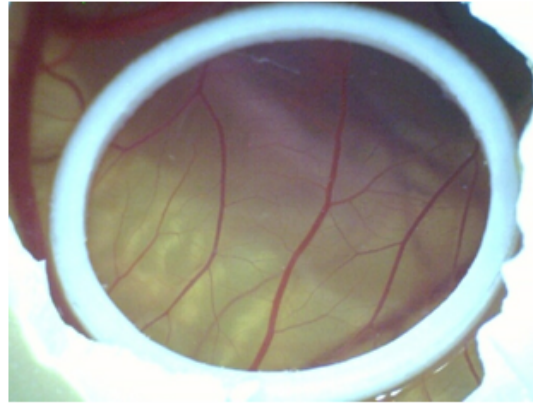
FS	Concentração	Redução (%)	Efeito observado
Porfirina	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	66 $\pm$ 17	Redução da rede vascular

CLORINA

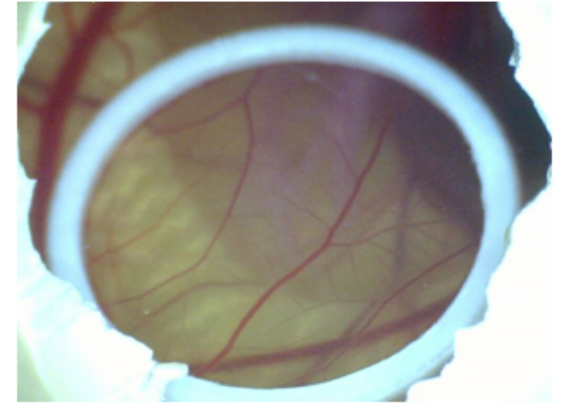
$0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$



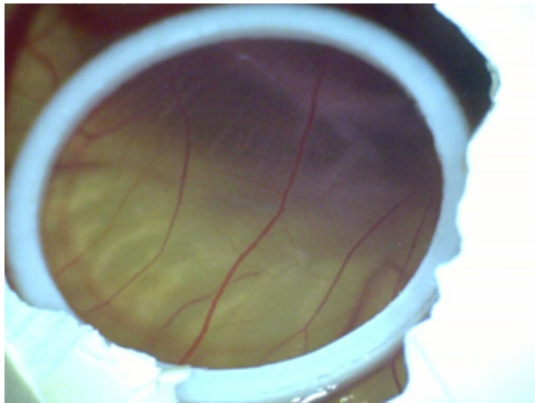
0min



30min



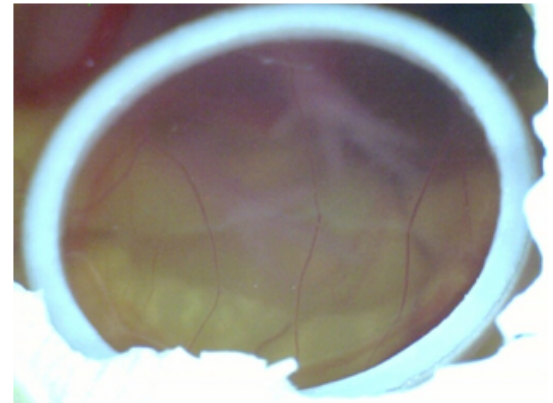
90min



150min



240min



300min

CLORINA

0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$



0min



30min



90min



150min



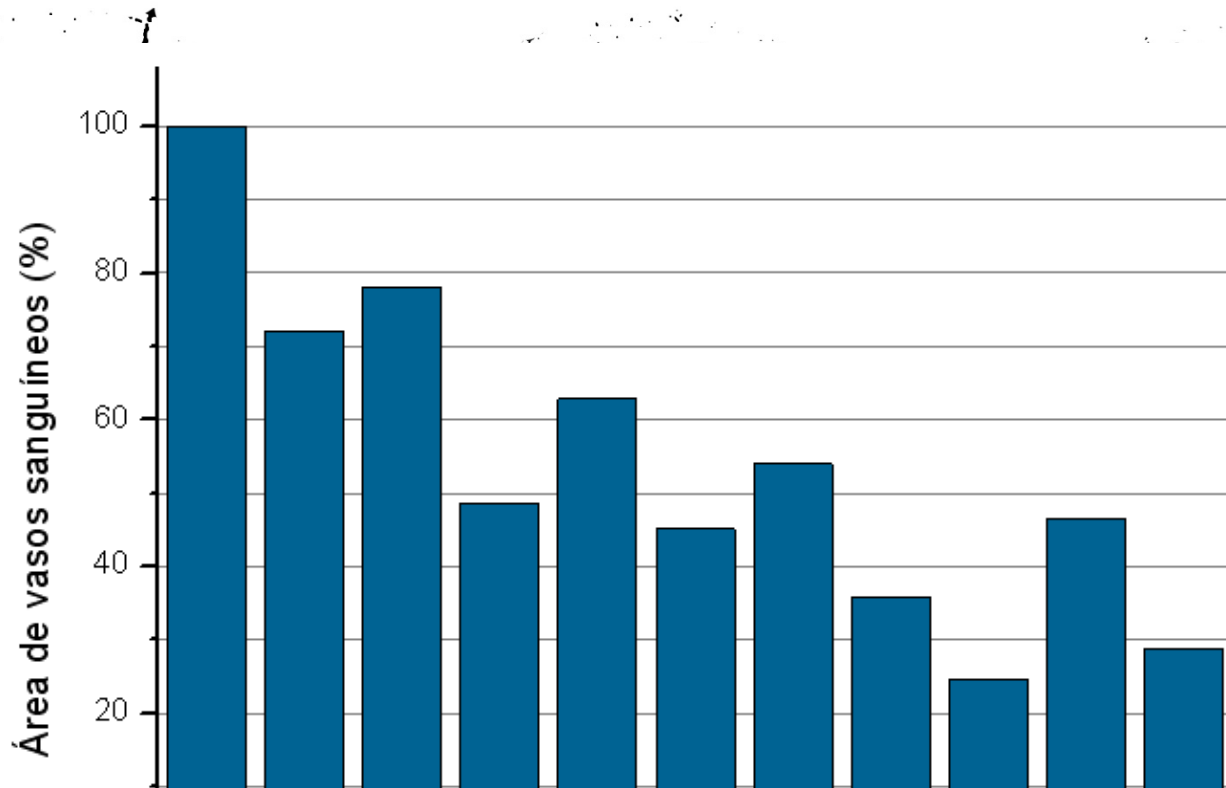
240min



300min

CLORINA

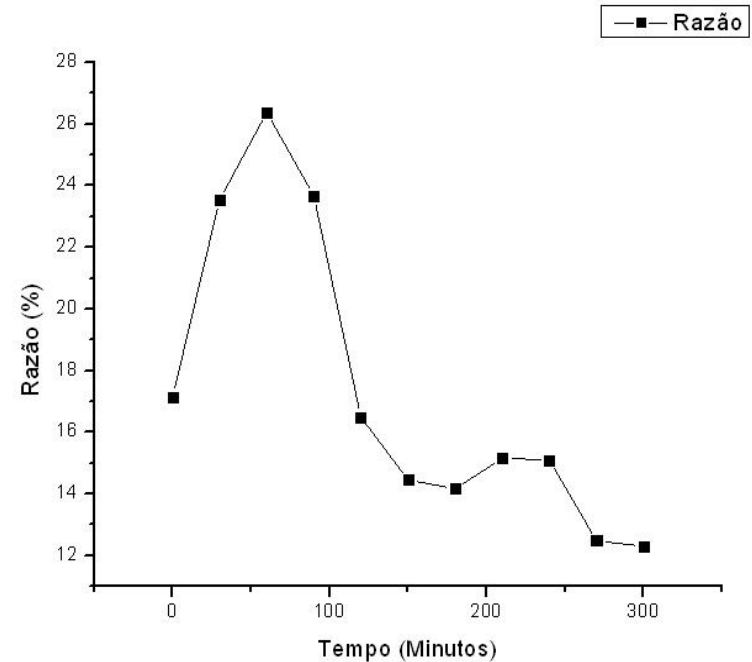
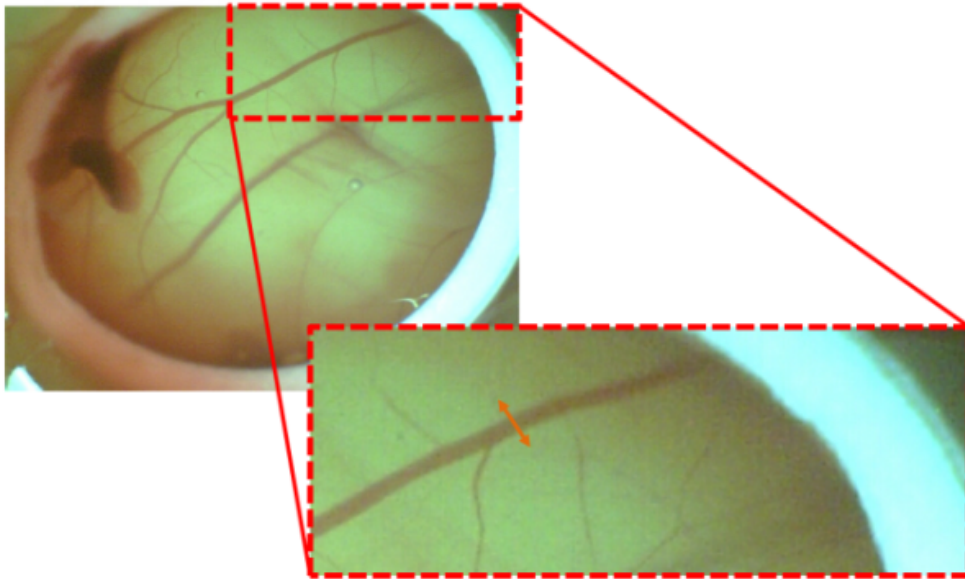
0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$



FS	Concentração o	Redução (%)	Comportamento do vaso pós-terapia	Diâmetro do vaso
Clorina	0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	43 $\pm$ 9	Destruição total Redução entre 30-70%	<156 μm >156 μm

PORFIRINA

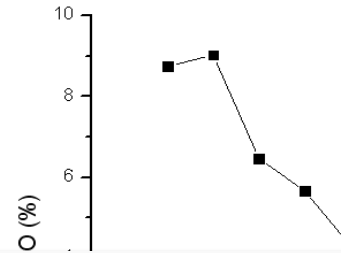
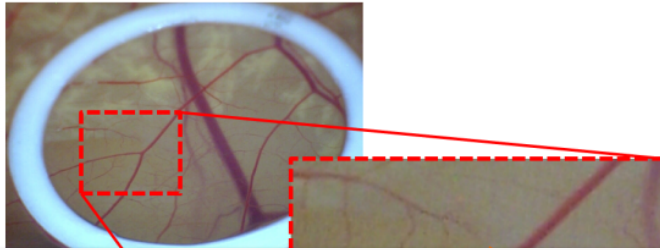
0,2 mg/mL



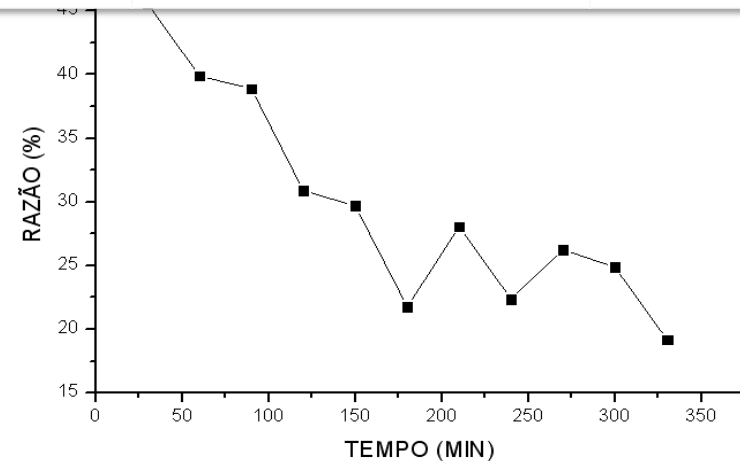
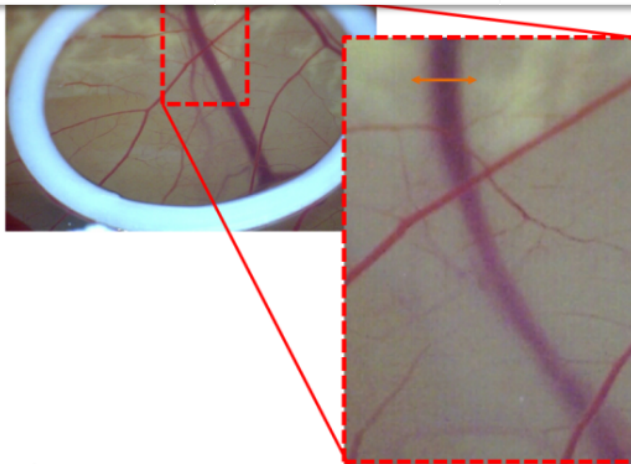
FS	Concentração	Redução (%)	Aumento (%)	Comportamento do vaso pós-terapia	Diâmetro do vaso
Porfirina	0,2 mg/mL	59 ± 13	3 ± 2	Destruição total	< 186 µm
				Redução de até 30% – camadas mais profundas	>186 µm
				Redução entre 30-	122

CLORINA

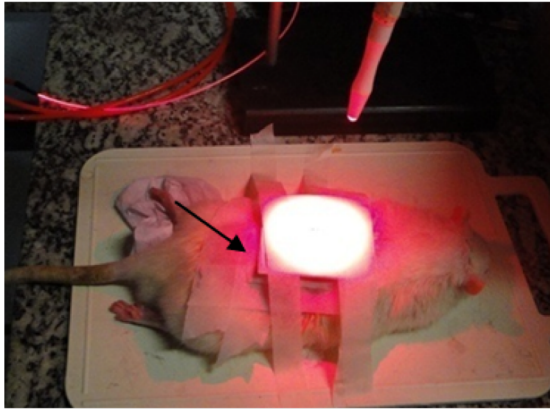
0,2 mg/mL



FS	Concentração	Redução (%)	Aumento (%)	Comportamento do vaso pós-terapia	Diâmetro do vaso
Clorina	0,2 mg/mL	73 ± 20	10 ± 10	Destruição total	<351 µm
				Redução de até 30% – camadas mais profundas	>351 µm



Material e métodos



DOSE (J/cm ²)	INTENSIDADE (mW/cm ²)	TEMPO (s)
30	50	600

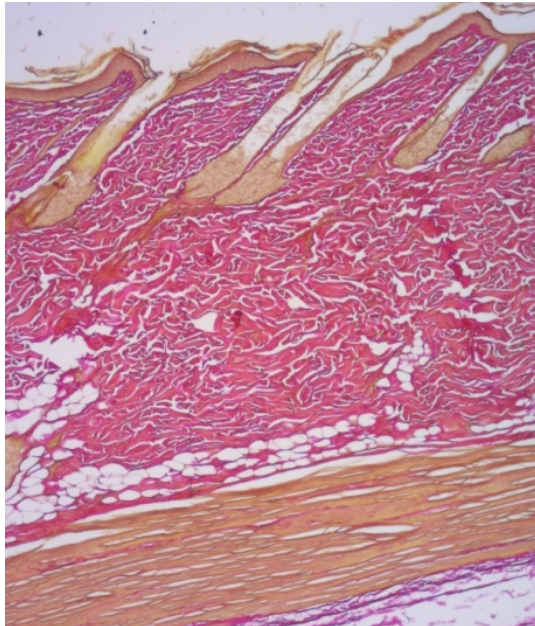
ALA 20%



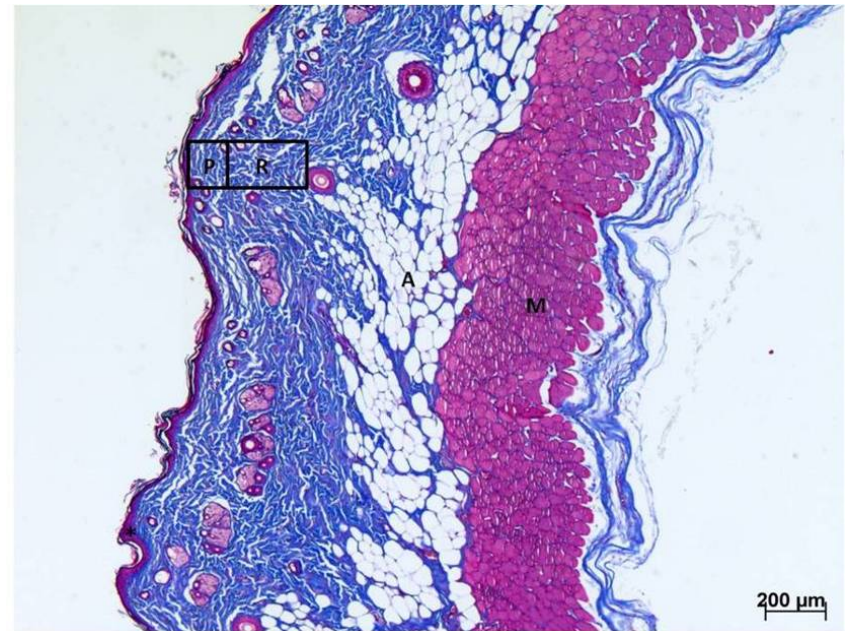
40Hz e uma potencia de 30W.

Material e métodos

Estudo Microscópico

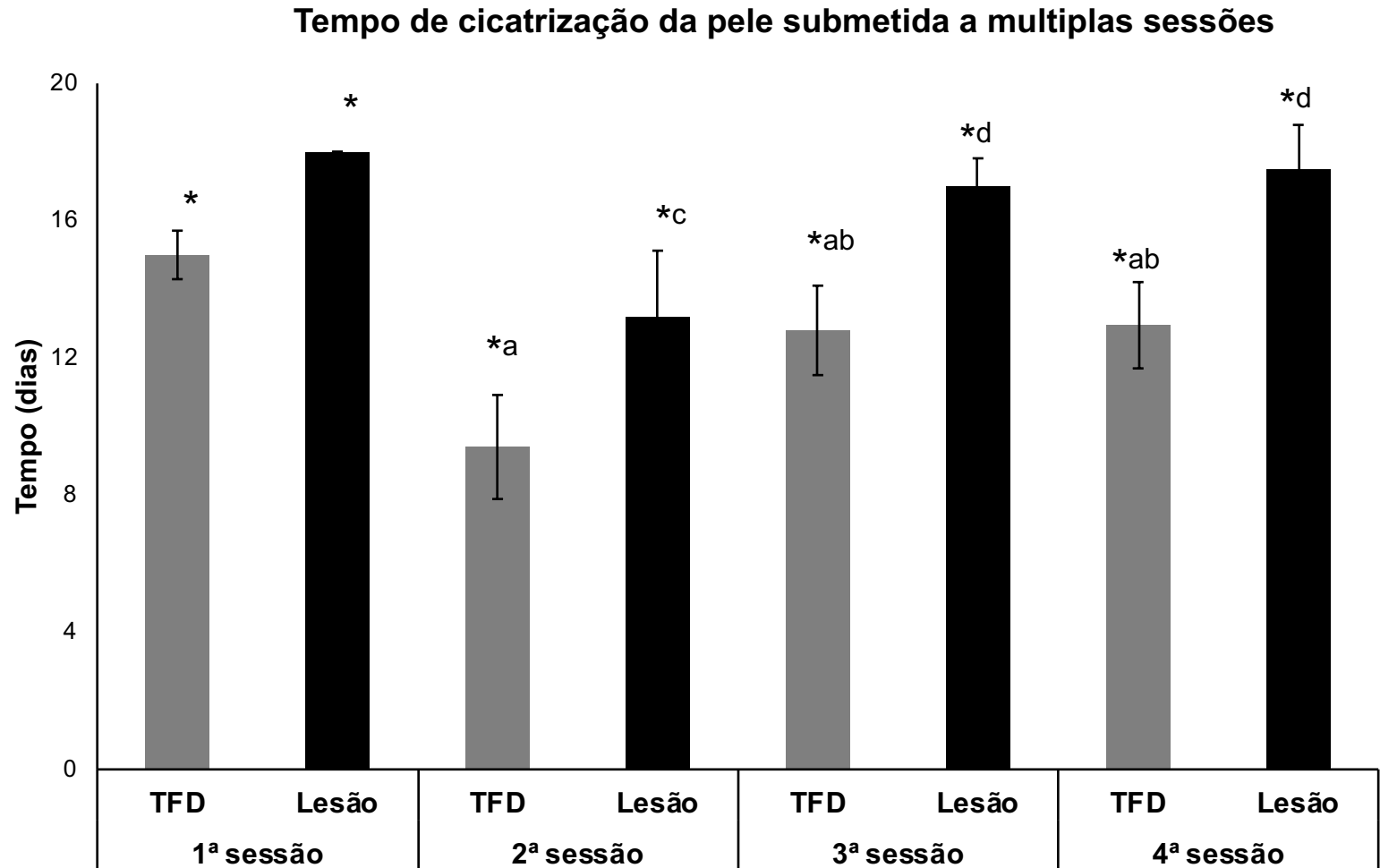


Veroff



Tricrômico de Masson

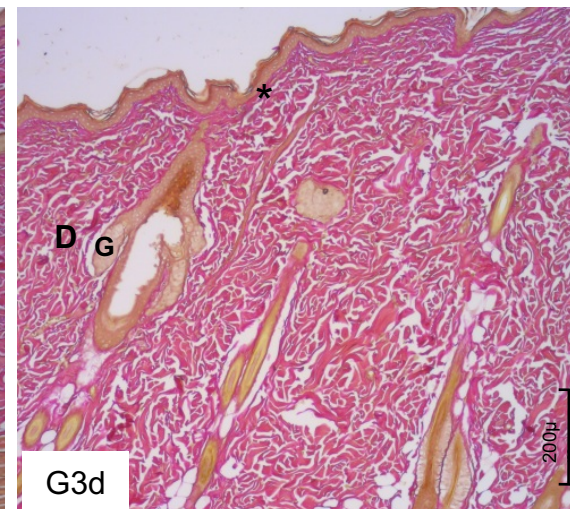
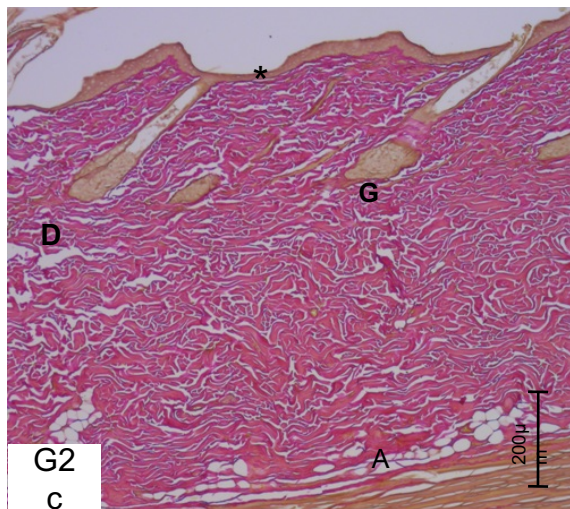
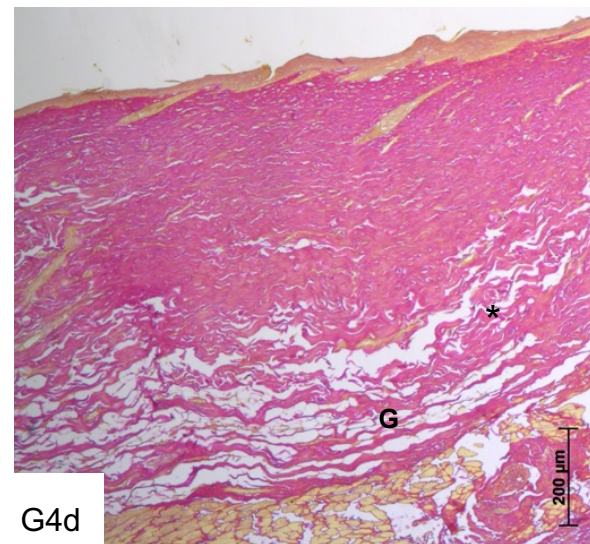
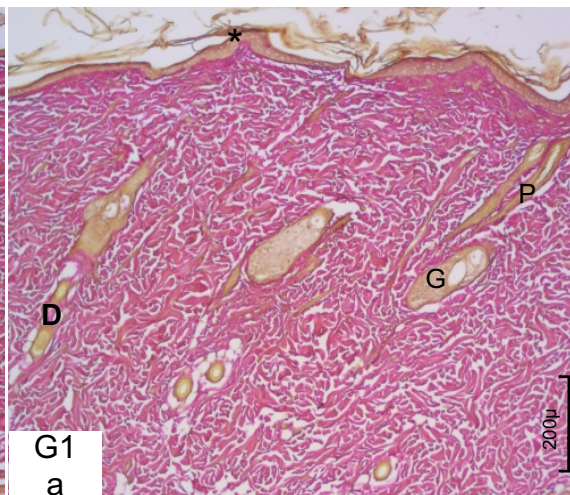
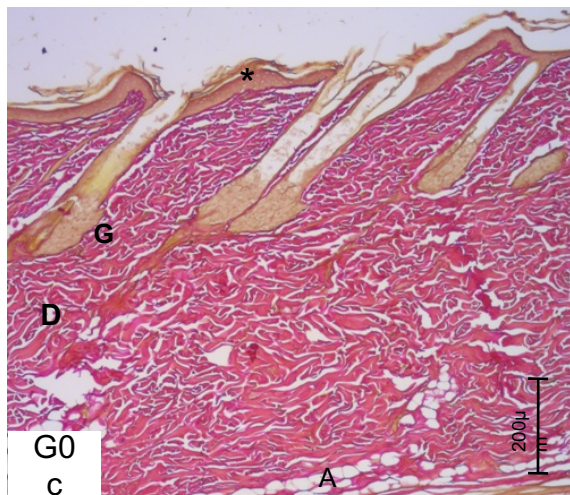
Resultados



*Diferença significativa intragrupo (TFD vs Lesão), $p < 0,05$

Resultados

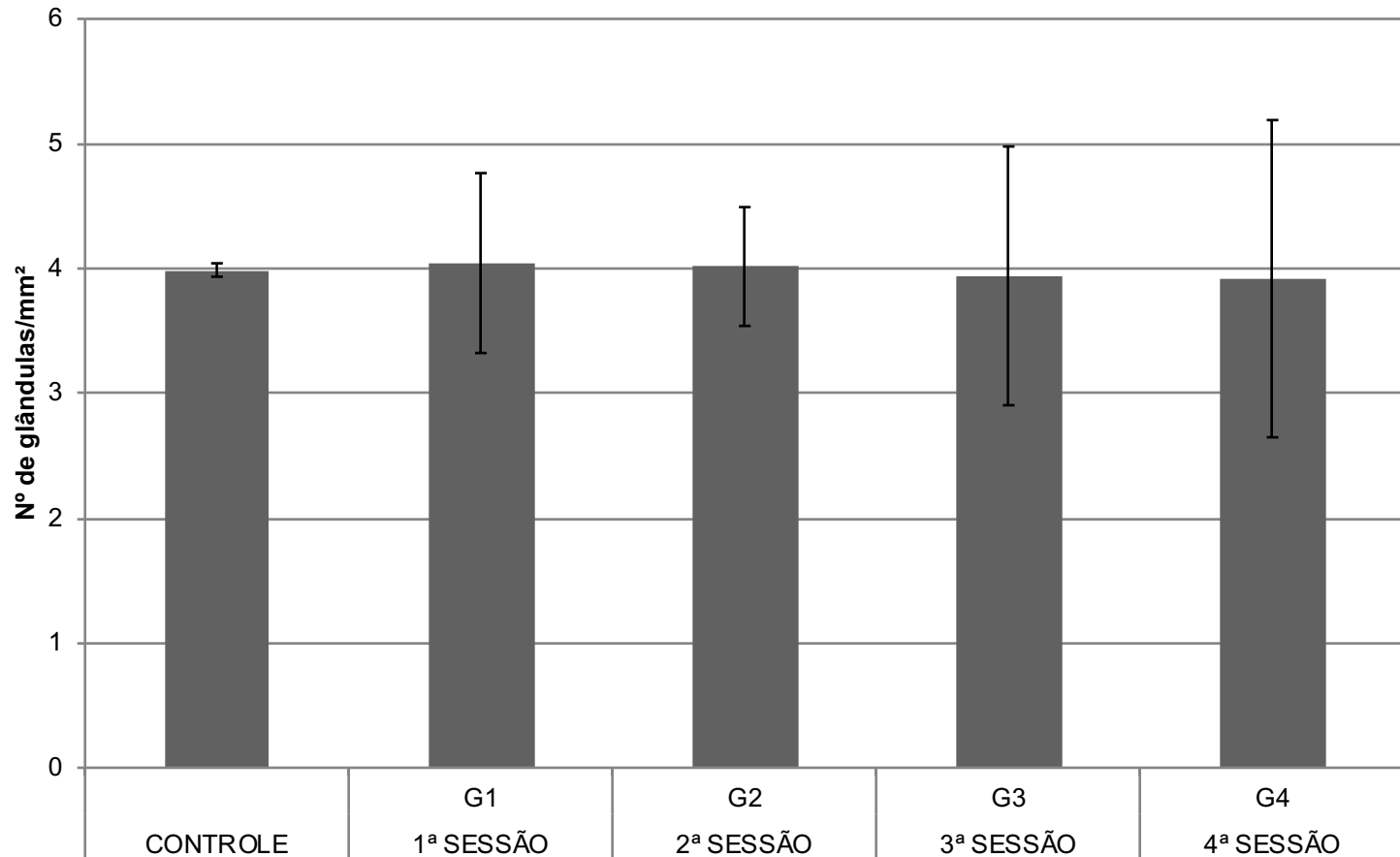
Glândulas sebáceas-Grupo TFD/Lesão



Fotomicrografia demonstrando a derme (D) e epiderme (*), camadas do tegumento e as unidades pilossebáceas, compostas do folículo piloso e da glândula sebácea [verhoff; 50x].

Resultados

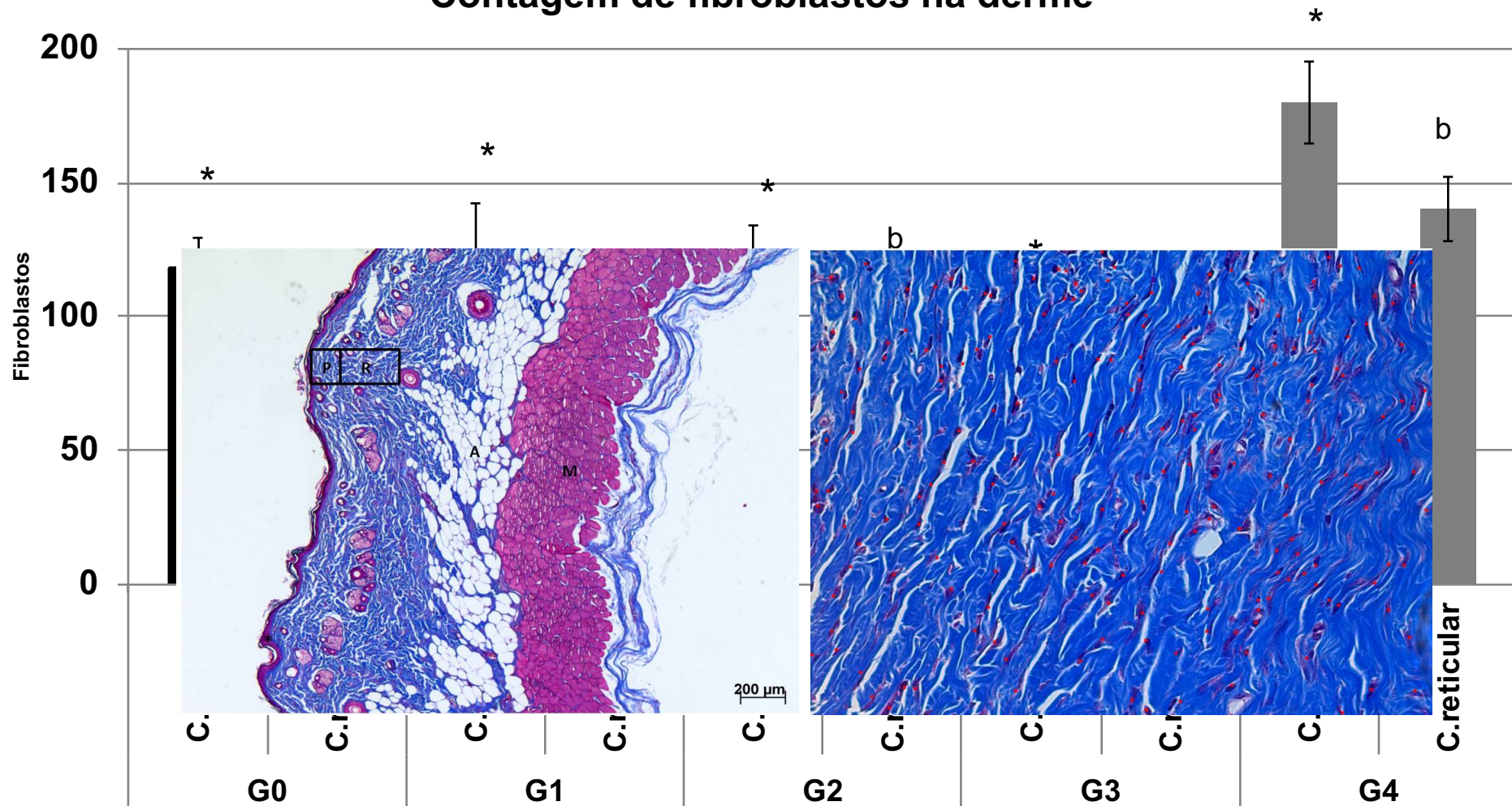
Concentração de Glândulas/mm²



Representação gráfica das médias aritméticas da concentração de glândulas/mm². Não apresentou diferença estatística intergrupo.

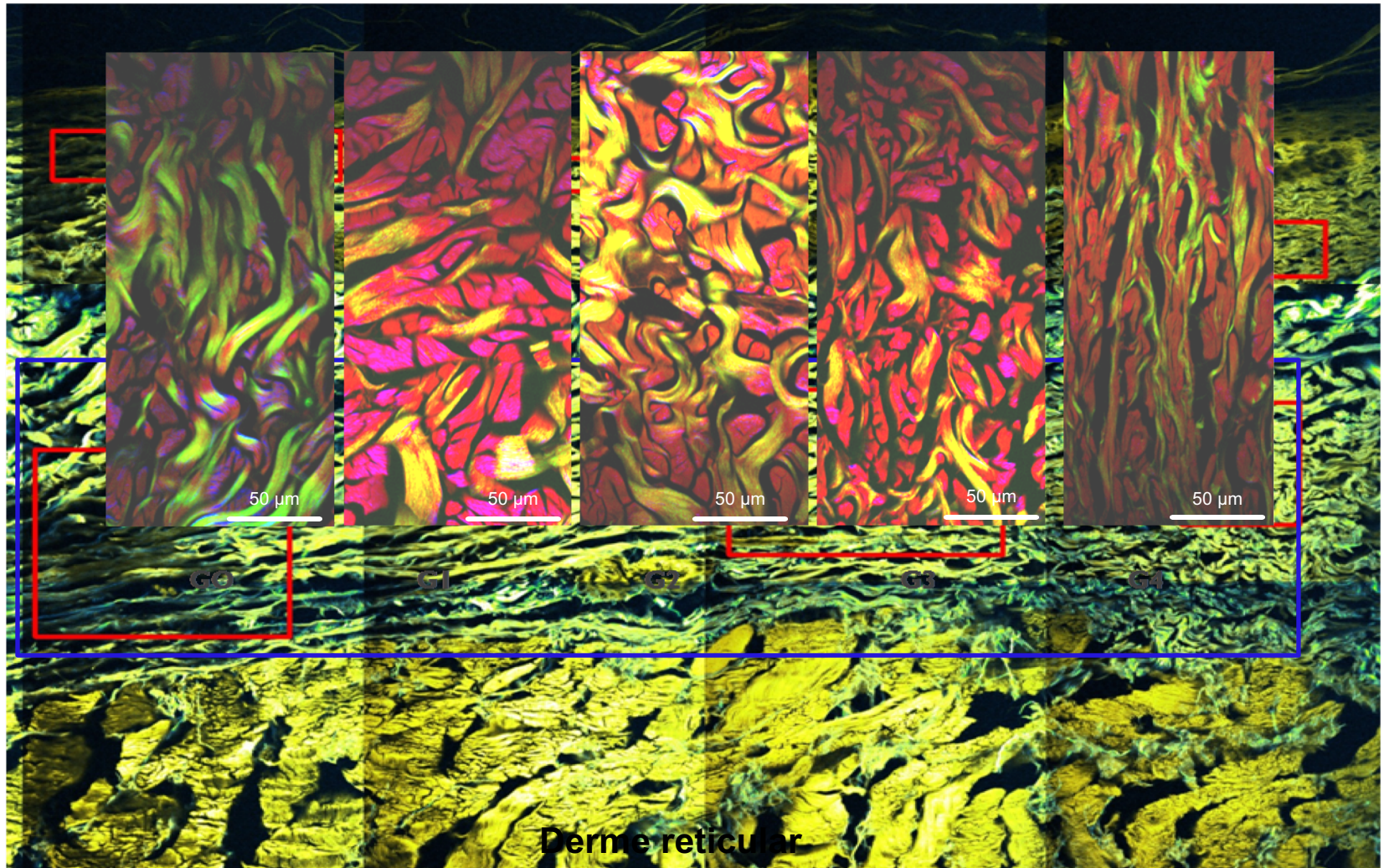
Resultados

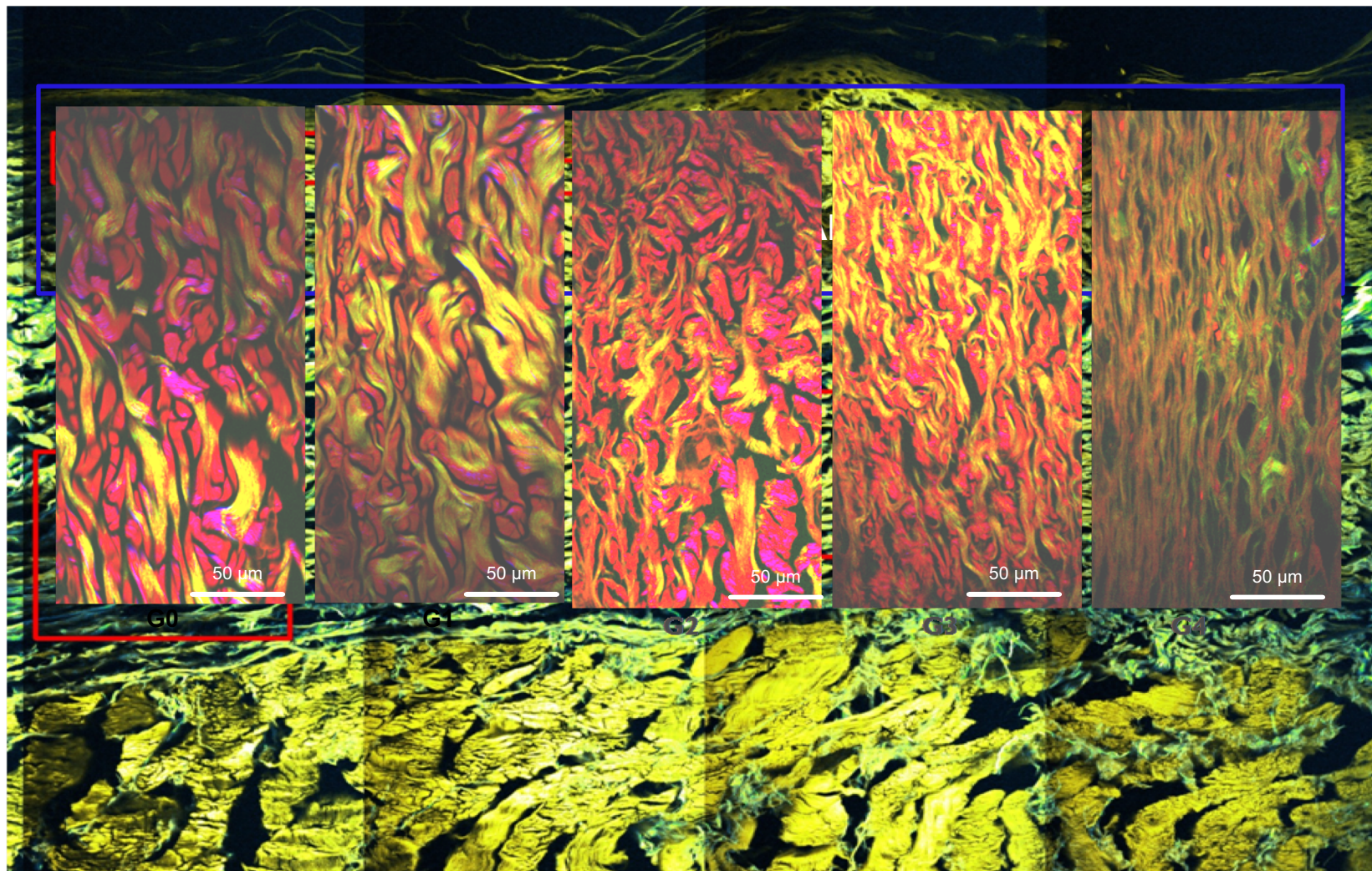
Contagem de fibroblastos na derme



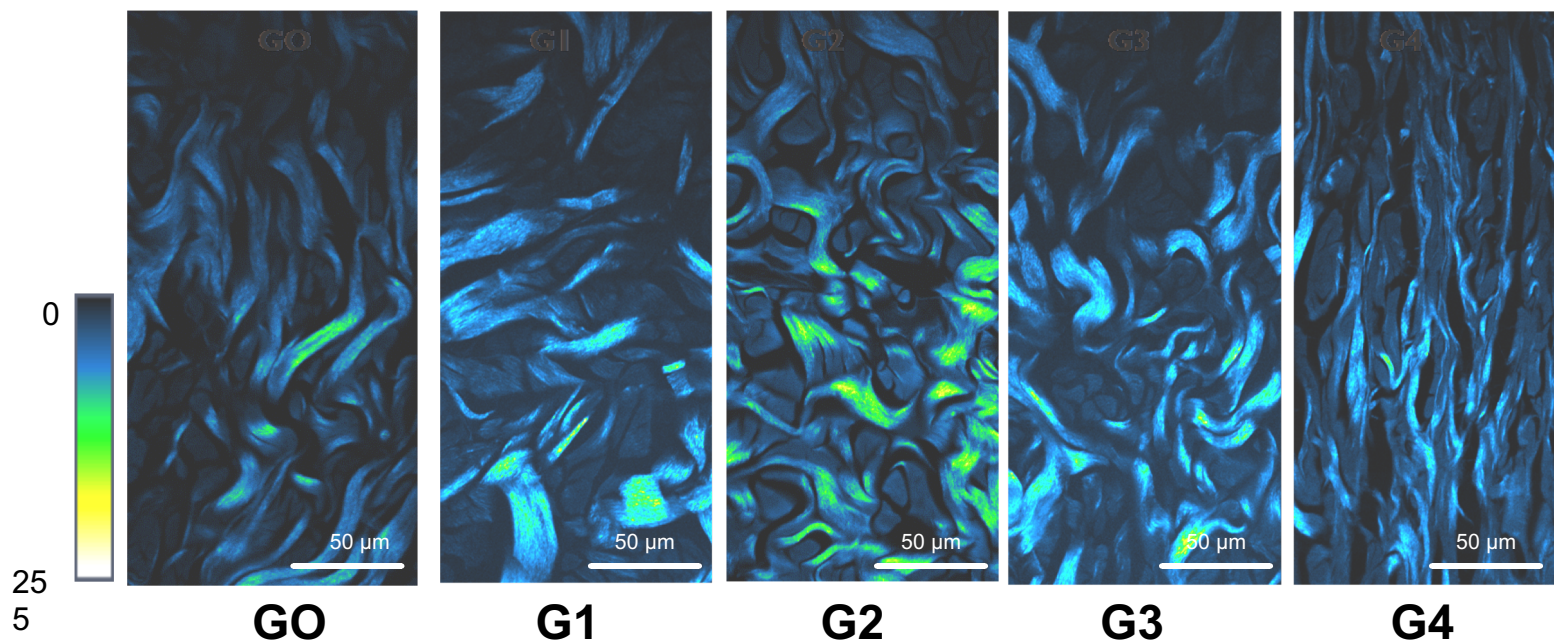
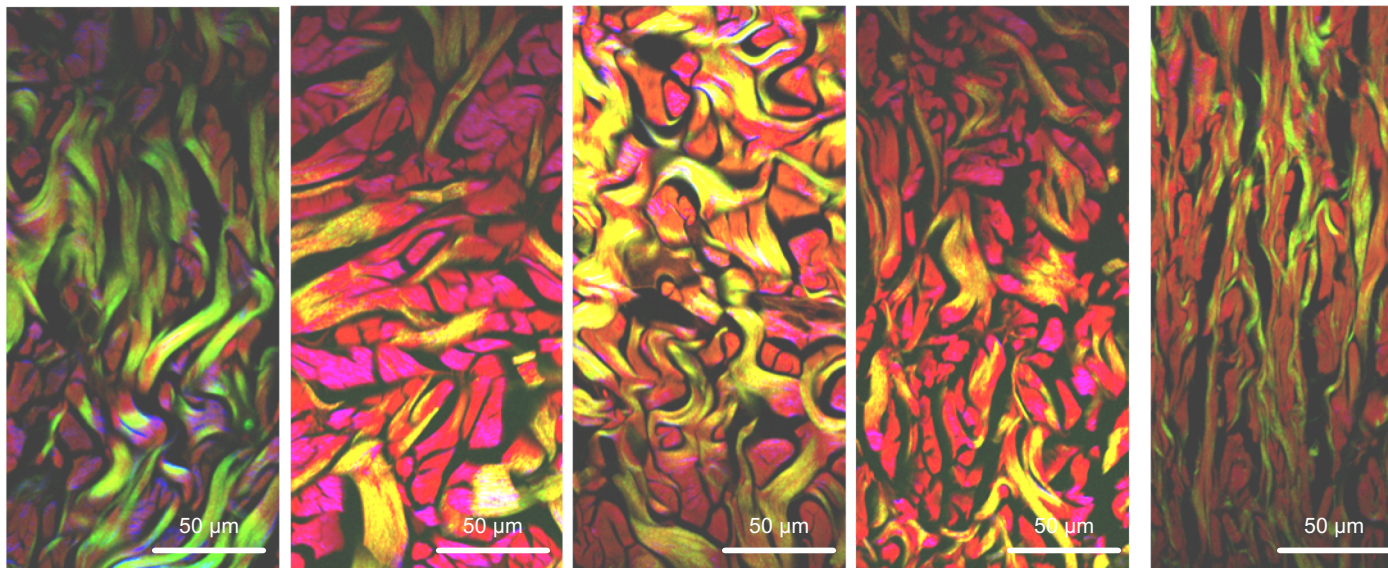
Representação da quantidade de fibroblastos encontrada na derme; as barras pretas representam o grupo controle. (*)Diferença significativa intergrupo- camada papilar (G4 vs 29 G0,G1,G2,G3), $p < 0,05$. (b) Diferencia significativa intergrupo –camada reticular (G4 vs G0,G1,G2,G3)

Microscopia multi-fotón, fluorescência das fibras de colágeno coradas com HE

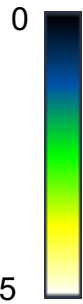
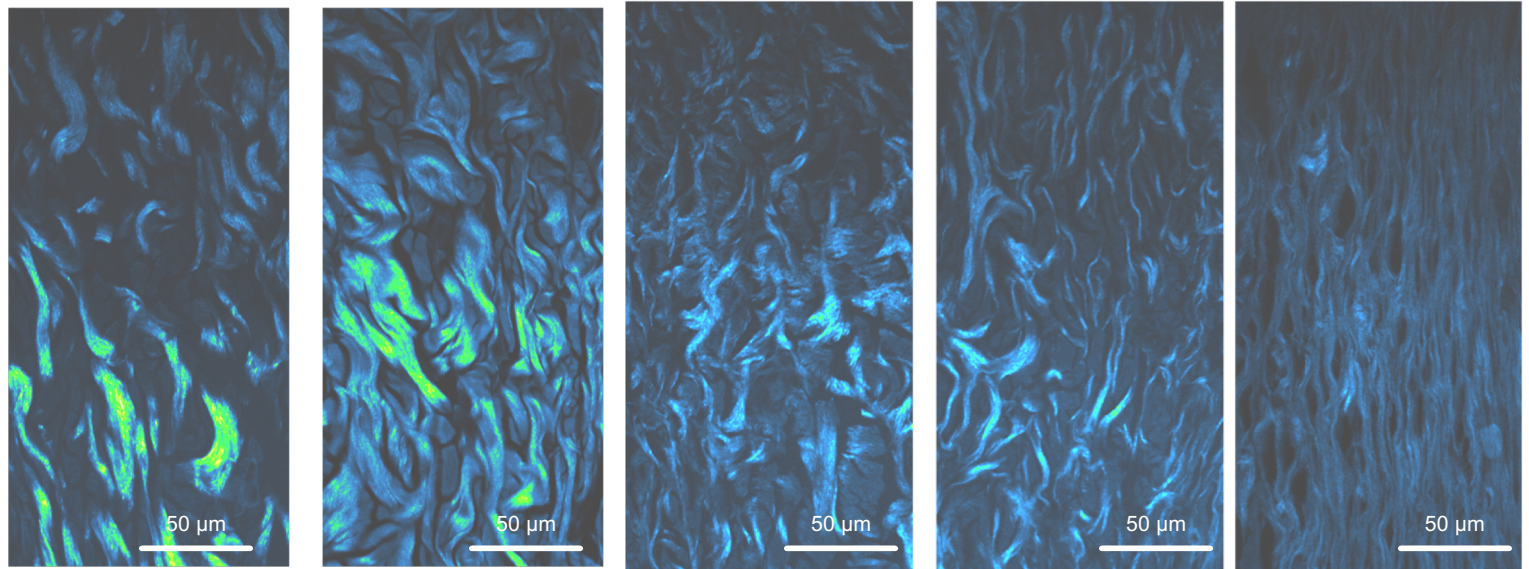
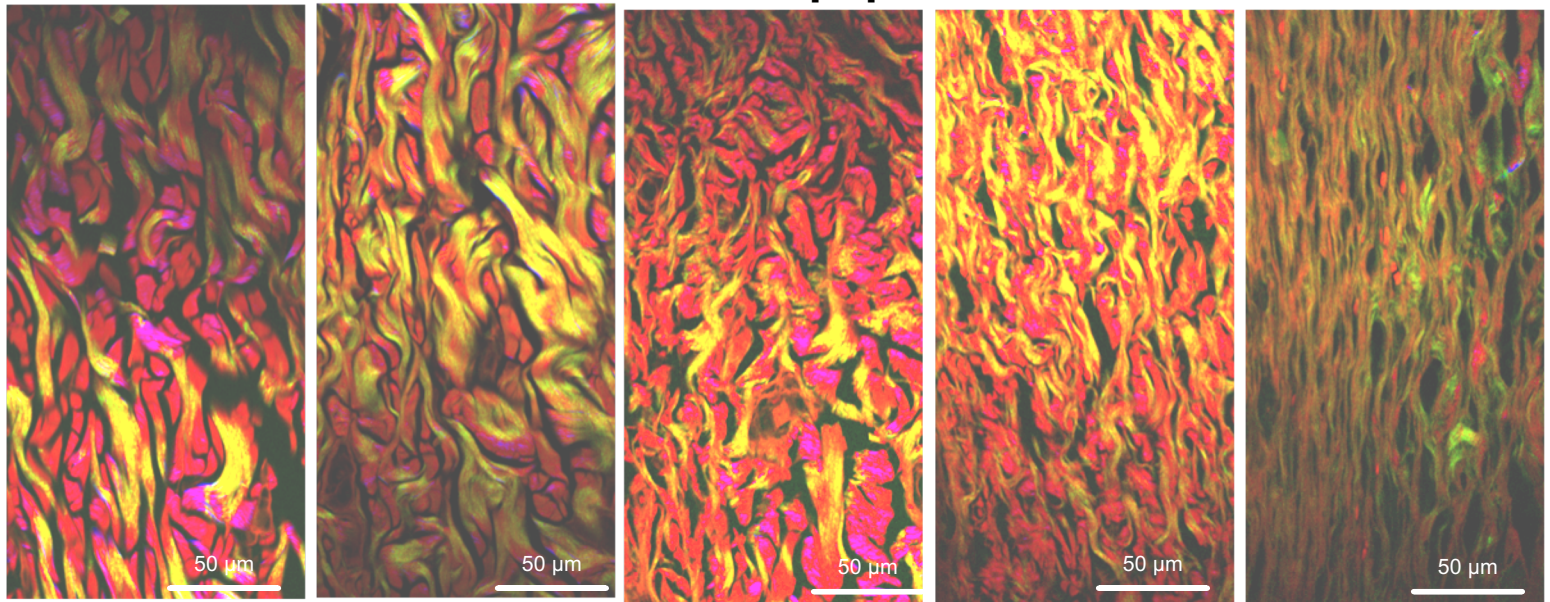




GERAÇÃO DO SEGUNDO HARMÔNICO



Derme papilar-SHG



GO

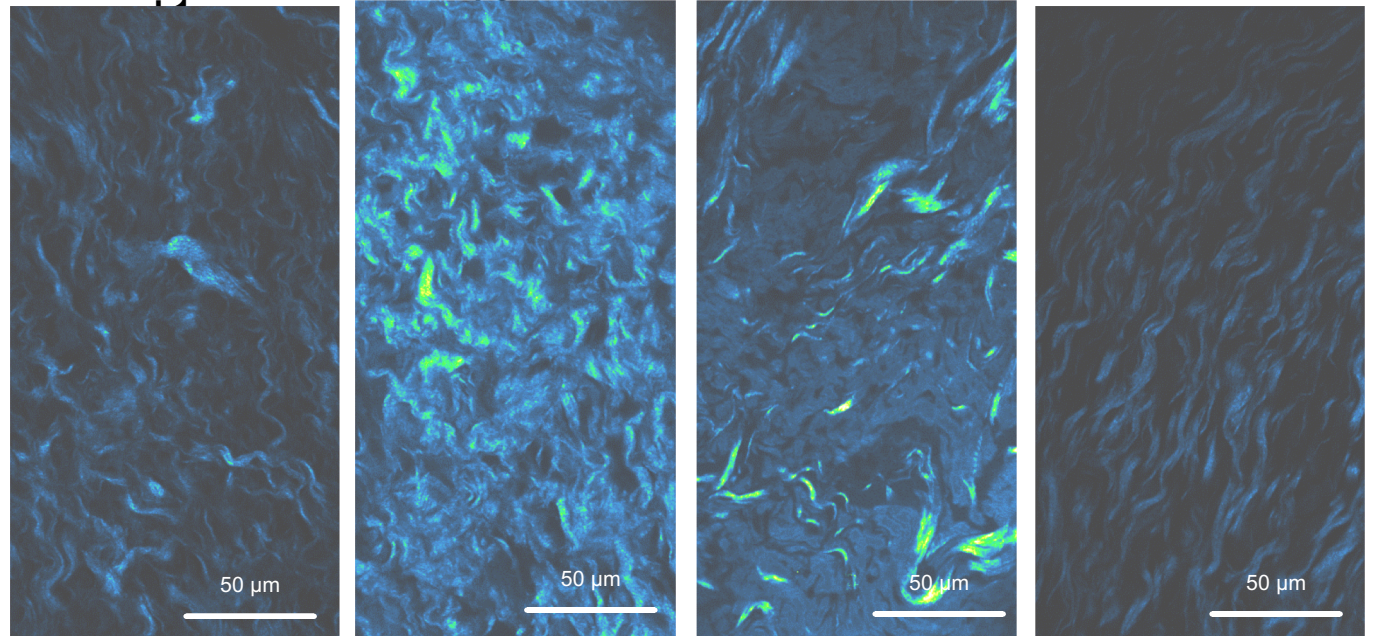
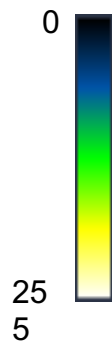
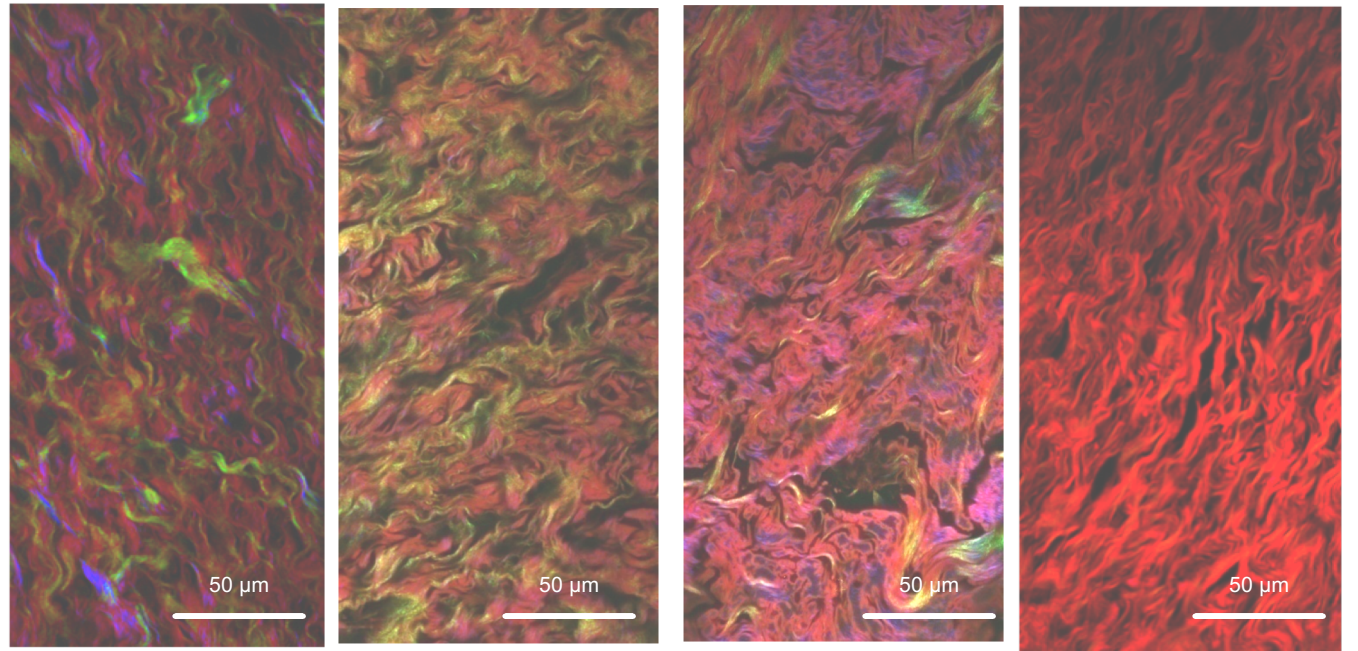
G1

G2

G3

G4

Derme reticular-SHG

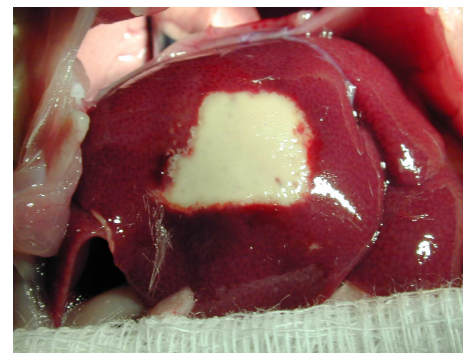
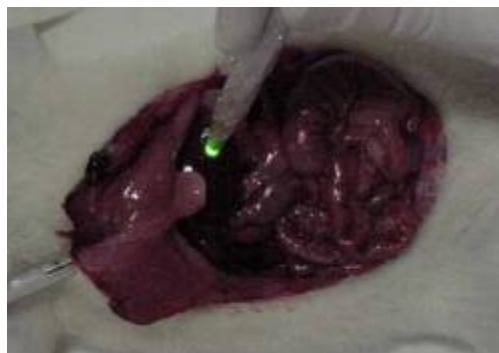
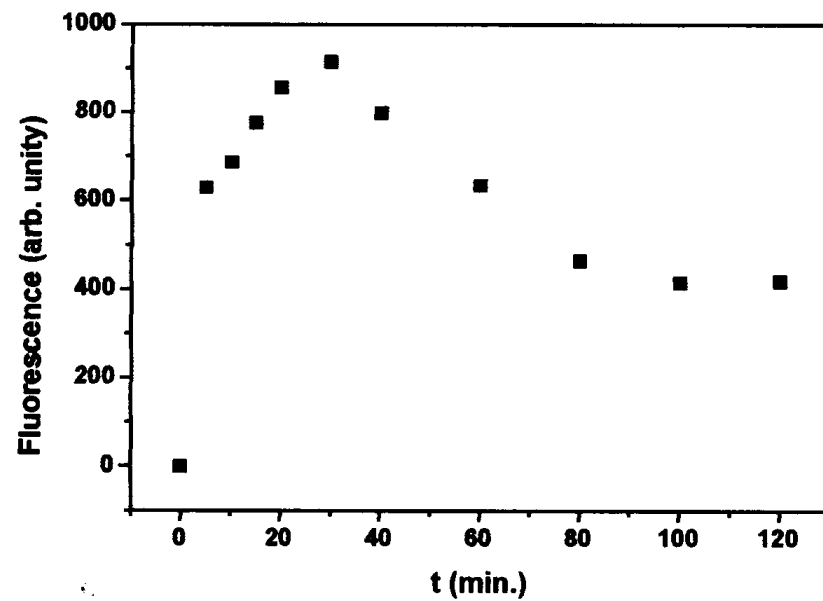
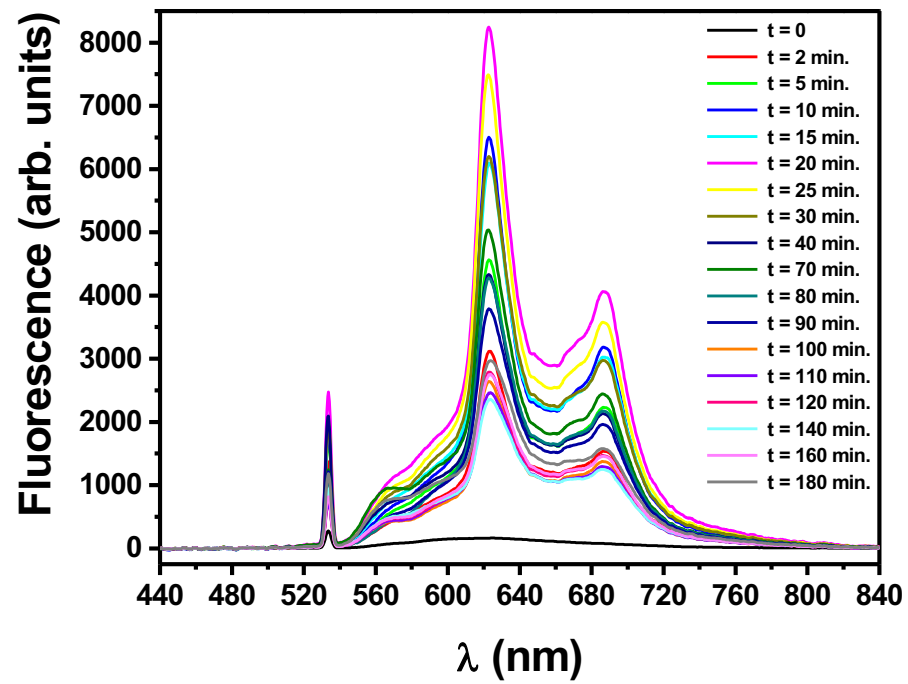


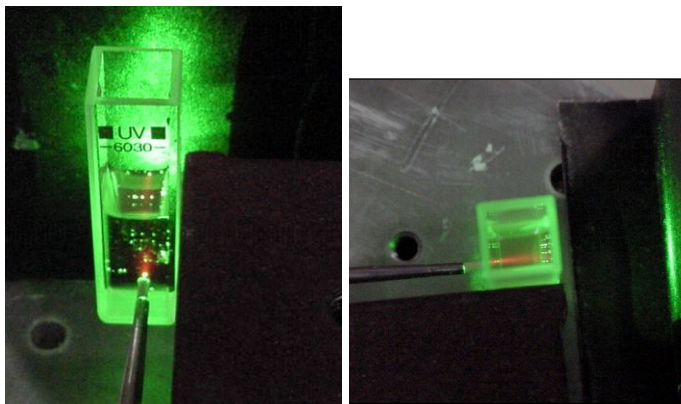
L1

L2

L3

L4

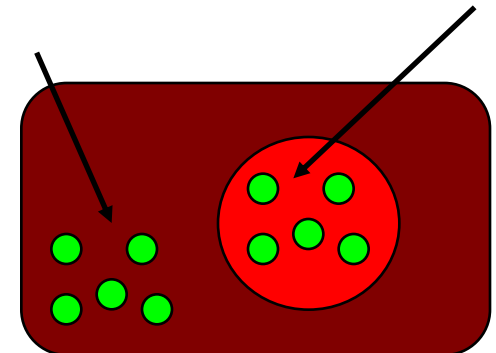
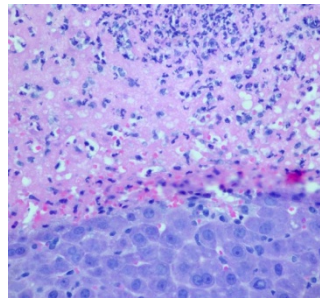
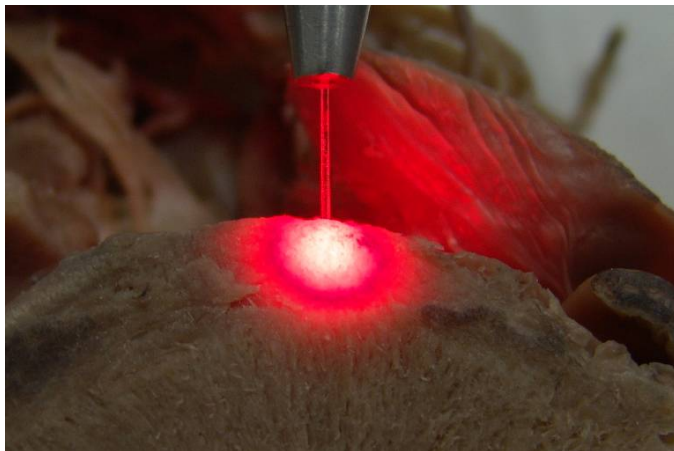
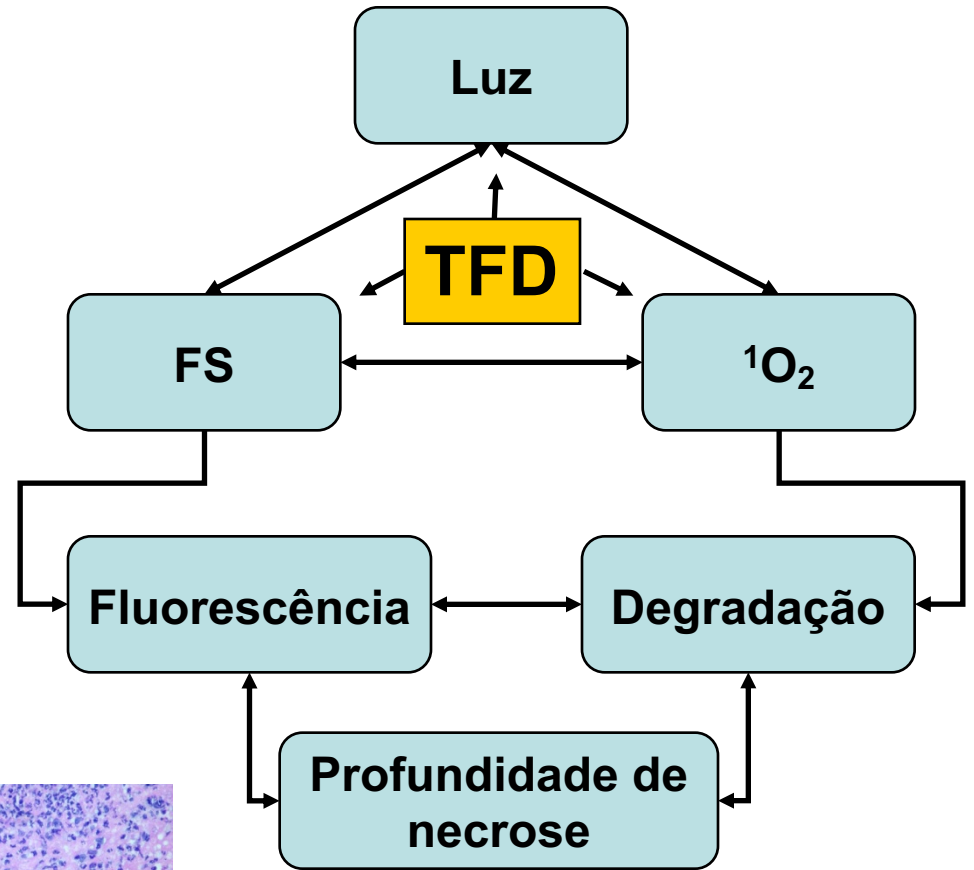




Dosimetria individualizada

- Detecção do FS
- Caracterização óptica do tumor

Previsão da profundidade de necrose



150 mW/cm²

