

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DO NOVO FOTOSSENSIBILIZADOR EM CÉLULAS DO MELANOMA OCULAR ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Tarcísio Guerra Guimarães¹⁻⁴, Karla Menezes Cardoso¹⁻⁴, Carlos Miguel Marto³⁻⁵, Ricardo Teixo³⁻⁵, Beatriz Serambeque³⁻⁵, Nelson Pereira⁶, Marta Piñeiro⁶, Teresa Pinho e Melo⁶, Nuno Alexandre^{2,7}, Maria Filomena Botelho³⁻⁵, Mafalda Laranjo³⁻⁵

¹Instituto de Investigação e Formação Avançada (IIFA), Universidade de Évora, Portugal.

²Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento da Universidade de Évora (MED), Portugal.

³Instituto de Investigação Clínica e Biomédica (iCBR), área de Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal.

⁴Centro de Inovação em Biomedicina e Biotecnologia (CIBB), Universidade de Coimbra, Portugal.

⁵Centro Académico Clínico de Coimbra (CACC), Portugal.

⁶Centro de Química de Coimbra, Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Portugal.

⁷Hospital Veterinário da Universidade de Évora e Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Portugal.

tarcisioguerra77@gmail.com*

Introdução: O melanoma ocular é o objetivo de várias investigações em medicina e medicina veterinária devido à baixa taxa de resposta aos tratamentos conservadores convencionais¹. A terapia fotodinâmica (PDT) é uma terapia mais conservadora para os tecidos não neoplásicos, que induz e ativa as vias de morte celular nos tecidos neoplásicos alvo^{2,3}. O fotossensibilizador, luz e oxigênio são os três componentes vitais não tóxicos da reação fotodinâmica. Quando o fotossensibilizador é ativado por uma fonte de luz (600-800 nm), ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que exerce efeito terapêutico sobre a neoplasia². A oxidação irreversível leva à morte da célula tumoral por apoptose, necrose e autofagia². A morte celular pode ser ativada pela via extrínseca, que envolve recetores da membrana plasmática, ou pela via

intrínseca, em que a mitocôndria tem um papel central^{2,3}. A localização subcelular dos fotossensibilizadores constitui o local de dano primário da terapia fotodinâmica e é determinante nas vias de atuação ativadas pela reação fotodinâmica³. Recentemente, desenvolvemos um grupo de novas clorinas, que são fotossensibilizadores muito eficazes em células de melanoma^{2,3,4}. Dessa forma o objetivo do trabalho foi avaliar a localização subcelular (núcleo e mitocôndria) da nova clorina em células do melanoma ocular.

Métodos: Células da linha celular de melanoma ocular (MP-41) cultivadas em meio RPMI com 25% de FBS, foram semeadas em placas de 24 poços com lamelas esterilizadas. As células foram incubadas com 500 nM da nova clorina (derivado dihidroximetilo de 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-a]piridina fundido com tetrafenilclorina) por 24 h. Após este período, as culturas foram submetidas a duas lavagens com PBS, de modo a remover todo o fotossensibilizador no exterior das células, e procedeu-se à marcação dos organelos. As células que foram marcadas com o corante nuclear Hoechst 33252 (blue) e incubadas com uma solução de 5 µg/ml da sonda em PBS durante 15 minutos no escuro. As culturas celulares que foram marcadas com a sonda mitocondrial MitoTracker[®] Green FM foram incubadas com uma solução de 200 nM da sonda em PBS durante 30 minutos, a 37°C, no escuro. Após as incubações com as respectivas sondas as células foram lavadas com PBS as lamelas foram montadas sobre lâminas e observadas ao microscópio confocal (Carl Zeiss MicroImaging LSM710, objetiva 40X) e fotografadas. As imagens foram analisadas no software ImageJ e a colocalização avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Resultados: Os estudos de localização subcelular confirmaram a internalização celular do novo fotossensibilizador. A média para coeficiente de Pearson foi -0,114 para colocalização nuclear, certificando a existência 43% de correlação negativa, para as imagens analisadas, demonstrando que não ocorre internalização nuclear do novo fotossensibilizador. No que respeita a mitocôndria, verificou-se a existência de 66%, correlação de Pearson positiva, que foi igual a média 0,366 para as imagens analisadas, demonstrando que ocorre internalização mitocondrial do novofotossensibilizador.

Conclusão: Verificou-se que o novo fotossensibilizador é captado pelas células de melanoma ocular e que se acumula nas mitocôndrias, mas não penetra no núcleo celular.

Financiamento: Este trabalho foi apoiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal e Fundo Social Europeu (FSE), através de uma bolsa de doutoramento atribuída a

T.G.G. (SFRH/BD/139319/2018), para R.T. (SFRH/BD/116794/2016) e para B.S. (2020.07672.BD). O CIBB é financiado por Fundos Nacionais via FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) através dos Projetos Estratégicos UID/NEU/04539/2019, UIDB/04539/2020, UIDP/04539/2020, e pelo COMPETE-FEDER (POCI-01-0145 -FEDER-007440).

BIBLIOGRAFIA:

¹Guimarães, T.G., Cardoso, K.M., Tralhão, P., Marto, C. M., Alexandre, N., Botelho, M. F., & Laranjo, M. (2021). Current Therapeutics and Future Perspectives to Ocular Melanocytic Neoplasms in Dogs and Cats. *Bioengineering*, 8(12), 225.

²Laranjo, M., Aguiar, M. C., Pereira, N. A., Brites, G., Nascimento, B. F., Brito, A. F., ... & e Melo, T. M. P. (2020). Platinum (II) ring-fused chlorins as efficient theranostic agents: Dyes for tumor-imaging and photodynamic therapy of cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 200, 112468

³Laranjo, M., Pereira, N. A., Oliveira, A. S., Aguiar, M. C., Brites, G., Nascimento, B. F., ... & e Melo, T. M. P. (2022). Ring-Fused meso-Tetraarylchlorins as Auspicious PDT Sensitizers: Synthesis, Structural Characterization, Photophysics, and Biological Evaluation. *Frontiers in chemistry*, 10.

⁴Pereira, N. A., Laranjo, M., Pineiro, M., Serra, A. C., Santos, K., Teixo, R., ... & e Melo, T. M. P. (2015). Novel 4, 5, 6, 7-tetrahydropyrazolo [1, 5-a] pyridine fused chlorins as very active photodynamic agents for melanoma cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 374-380.