

## **Protocolo de visualização da localização do FS nas estruturas celulares**

### **Descrição do experimento**

A eficiência da terapia fotodinâmica depende de alguns fatores. Um deles é a localização do fotosensibilizador (FS), molécula que é ativada por luz e é responsável pela produção de espécies citotóxicas que podem gerar morte celular. Quando o FS se localiza em organelas críticas para a sobrevivência celular, o dano causado pela TFD é maior. Nesse experimento vamos verificar a localização do FS Photogem nas células tumorais de mama através da marcação das estruturas celulares que possam ter afinidade pelo FS utilizado. Serão utilizados 2 tempos de incubação do FS e em seguida as células serão fixadas e marcadas com DAPI para visualização do núcleo e com MITOtracker para visualização das mitocôndrias.

### **Marcação com MitoTracker**

Preparo de soluções

A partir da solução estoque de xxx preparar 2 mL solução de trabalho de 50 nM.

1. Adicionar xx  $\mu$ L da solução estoque em xx  $\mu$ L de PBS.
- Marcação
1. Adicione de 500 a 1000 uL da solução de trabalho para cobrir as células
  2. Incube de 15 a 45 min. Proteja de luz.
  3. Remova a solução de marcação e lave os poços de 2-3 vezes com PBS

### **Fixação das células**

1. Após os tempos de incubação do FS, remova o meio de cultura e lave 2x com PBS
2. Incube as células com formaldeído de 2 a 4% de 10 a 15 min, a 37°C
3. Remova o formaldeído e lave as células 3x com PBS

### **Marcação com DAPI**

- Preparo de soluções

Preparar previamente 2 mL da solução de 300 nM a partir da solução estoque.

1. Adicionar 2  $\mu$ L da solução estoque (300  $\mu$ M) em 1998  $\mu$ L de PBS

- Marcação

1. Adicione de 500 a 1000  $\mu$ L da solução de DAPI de 300 nM para cobrir as células
2. Incube de 1 a 5 min. Proteja de luz.
3. Remova a solução de marcação e lave os poços de 2-3 vezes com PBS

### **Microscopia Confocal**

1. Para visualizar a localização do núcleo, a amostra deve ser excitada em torno de 458 nm e a coleta da fluorescência em torno de 561 nm
2. Para visualizar a localização das mitocôndrias, a amostra deve ser excitada em 579 nm e a coleta da fluorescência deve ser em 599 nm.