



Evento	Salão UFRGS 2020: SIC - XXXII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2020
Local	Virtual
Título	Construção do vetor pbAMPKAR como alternativa para análise temporal da enzima AMPK em células tumorais
Autor	DAPHNE TÓRGO DE LEMOS
Orientador	GUIDO LENZ

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Construção do vetor pbAMPKAR como alternativa para análise temporal da enzima AMPK em células tumorais

Aluna: Daphne Tórgo de Lemos

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Justificativa: Uma das características adquiridas durante a tumorigênese envolve a reprogramação do metabolismo energético de forma a sustentar a proliferação exacerbada. A AMPK participa da regulação da homeostase metabólica, servindo como sensor energético. Adicionalmente, ela está inserida em uma rede supressora tumoral pois é regulada por LKB1 e regula p53 e TSC2, todas proteínas supressoras tumorais, além de regular a mTOR, de forma a contribuir para a supressão tumoral ao induzir autofagia, uma vez que redução de autofagia tem ligação com a tumorigênese. Nesse caso, a indução de AMPK poderia ser usada na atenuação de processos tumorais, fazendo dela um possível alvo dentro tratamento de câncer. **Objetivo:** criar uma linhagem tumoral transgênica com marcação fluorescente estável para a atividade da AMPK. **Metodologia:** o vetor pbAMPKAR foi criado a partir de uma subclonagem entre AMPKAR e PbNTPD5, validada por PCR de colônia. O vetor clonado foi purificado e replicado em bactérias *E. coli*, que tiveram seu DNA plasmidial purificado por Miniprep e testado em células HEK transfectadas por Lipofectamina 3000. Células A-172 passaram por transposição usando o vetor pbAMPKAR juntamente da enzima transposase, através de Lipofectamina 3000. As células A-172 pbAMPKAR-positivas, cultivadas em DMEM Low 10% SFB, foram selecionadas com geneticina 50 mg/ μ L. **Resultados:** a digestão dos vetores foi bem sucedida, havendo aparecimento dos dois fragmentos nos tamanhos esperados, bem como aparecimento do tamanho esperada após ligação e amplificação por PCR. A transfecção do pbAMPKAR em HEK foi eficiente (taxa de transfecção >90%). A transposição do pbAMPKAR nas células A-172 resultou em uma baixa taxa de transposição (<10%), porém houve a incorporação cromossomal do vetor uma vez que células continuaram expressando a proteína fluorescente mesmo após aproximadamente 3 passagens. Os próximos passos incluem avaliar a atividade da AMPK nas células A172 transpostas através de fluorescência confocal de células tratadas com ionomicina.