

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

DAPHNE TÓRGO DE LEMOS

**PRODUÇÃO DE LINHAGEM TUMORAL COM EXPRESSÃO ESTÁVEL DE
MARCADOR DA ATIVIDADE DE AMPK PARA ANÁLISE TEMPORAL EM
CÉLULAS ÚNICAS**

Porto Alegre

2020

DAPHNE TÓRGO DE LEMOS

PRODUÇÃO DE LINHAGEM TUMORAL COM EXPRESSÃO ESTÁVEL DE
MARCADOR DA ATIVIDADE DE AMPK PARA ANÁLISE TEMPORAL EM CÉLULAS
ÚNICAS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz
Coorientadora: MSc. Luana Suéling Lenz

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Tórigo de Lemos, Daphne
PRODUÇÃO DE LINHAGEM TUMORAL COM EXPRESSÃO ESTÁVEL
DE MARCADOR DA ATIVIDADE DE AMPK PARA ANÁLISE TEMPORAL
EM CÉLULAS ÚNICAS / Daphne Tórigo de Lemos. -- 2020.
69 f.
Orientador: Guido Lenz.

Coorientadora: Luana Suéling Lenz.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. AMPK. 2. Metabolismo energético tumoral. 3.
FRET. 4. Single Cell. 5. Biologia Molecular. I. Lenz,
Guido, orient. II. Suéling Lenz, Luana, coorient.
III. Título.

DAPHNE TÓRGO DE LEMOS

**PRODUÇÃO DE LINHAGEM TUMORAL COM EXPRESSÃO ESTÁVEL DE
MARCADOR DA ATIVIDADE DE AMPK PARA ANÁLISE TEMPORAL EM
CÉLULAS ÚNICAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 15 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Liziane Raquel Beckenkamp - UFCSPA

Prof. Dr. Marcelo Lamers - UFRGS

MSc. Luana Lenz – UFRGS (coorientadora)

Prof. Dr. Guido Lenz - UFRGS (orientador)

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer à minha mãe **Katia** e ao meu irmão **Pedro**, que acompanharam tudo de perto, todos os dias. Por sempre terem acreditado no meu potencial e nunca terem deixado eu duvidar de mim mesma. Por toda a paciência, amor, incentivo e principalmente pela compreensão da minha ausência, que eu sei que foi frequente.

Ao meu **Dindo**, por todo o amor incondicional que eu recebi, não só durante esses cinco anos, mas durante a vida inteira. Por todo o carinho, colo e mimos. Por sempre ter me colocado em primeiro lugar e por nunca ter me deixado faltar absolutamente nada, em nenhum sentido.

Ao meu tio “**Xuxu**”, que eu nunca tive a oportunidade de agradecer por ter me incentivado e acreditado em mim antes do começo de tudo, e por isso ter investido na minha educação sem nem pensar duas vezes.

Ao meu namorado **Pedro**, por ter dividido toda a experiência da faculdade ao meu lado. Por crescer junto comigo. Por todo o amor, carinho, risadas, apoio, conselhos, colo, compreensão, puxões de orelha e incentivo. Por sempre ter compreendido a exigência de tempo e dedicação que eu precisei dar à minha formação.

Aos primeiros amigos que eu fiz na faculdade **Deila, Rafael e Simone**. Por estarem do meu lado desde o início. Por chorarem (muito) junto comigo, por rirem junto comigo. Por todos os aniversários-surpresa, por sempre terem feito eu me sentir amada e acolhida durante os anos mais difíceis.

Às minhas amigas que vieram depois **Luiza B., Maria Luísa e Vitória**. Por todo o carinho e apoio que vocês nunca mediram em demonstrar. Por vocês sempre me lembrarem que eu sou importante e especial e, principalmente, por terem passado por essa etapa final junto comigo.

À **Luiza C.** e à **Thayana**, pela amizade que a gente construiu ao longo desses 4 anos sendo colegas de IC. Por todo o carinho, apoio, torcida e por sempre me incentivarem a acreditar em mim mesma.

Ao **Prof. Guido** e à **Luana**, que me orientaram durante praticamente toda a minha graduação e durante todo o TCC. Por terem acreditado na minha capacidade, por todos os ensinamentos e pela imensa paciência.

Aos colegas do LabSinal, por todos os anos de convivência diária, parceria e ajuda.

Eu não teria chegado até aqui sem o apoio de vocês. Foi uma jornada bem difícil, mas vocês fizeram dela pouco mais leve.

Obrigada.

RESUMO

O desenvolvimento tumoral, dentre todos os seus outros aspectos complexos, depende da adaptação celular à sua própria mudança de comportamento, fazendo com que a reprogramação do metabolismo energético tenha uma importância muito grande nesse processo. A rede de manutenção da homeostase energética celular conta com o papel de uma quinase que atua como um sensor energético, controlando os processos catabólicos e anabólicos que são necessários para que exista o equilíbrio da razão ATP/AMP: a AMPK. O papel da AMPK acaba se misturando também no campo da tumorigênese, uma vez que ela está diretamente inserida em uma rede de sinalização supressora tumoral, o que faz dela uma potencial estratégia de uso na compreensão e tratamento de tumores. O presente trabalho teve como objetivo a produção de uma linhagem tumoral transgênica com expressão estável de uma sonda-repórter que é capaz de responder à atividade da AMPK, detectável por FRET, a partir do desenvolvimento de um vetor transponível. Esse vetor foi construído a partir de uma subclonagem molecular que uniu o inserto carreador da sonda-repórter ao *backbone* que carrega a maquinaria de inserção cromossomal do sistema *piggyBac*. O resultado dessa produção disponibiliza uma nova alternativa para a análise da relação do papel da AMPK dentro da sobrevivência tumoral, uma vez que pode ser feita a longo prazo, devido a sua expressão estável, e a nível de células individuais.

Palavras-chave: Câncer. AMPK. FRET. *PiggyBac*. Transposon. *Single Cell*.

ABSTRACT

The tumorigenesis, among all its other complex aspects, depends on the cellular adaptation to its own change of behavior, making the metabolic reprogramming very important in this process. The maintenance network of the cellular energetic homeostasis depends on the role of a kinase that acts as an energetic sensor, controlling the catabolic and anabolic processes that are necessary for the ATP/AMP balance ratio to exist. This role belongs to AMPK and it also blends into the field of tumorigenesis, since it is directly inserted into a tumor suppressive signaling network and this makes of it a potential strategy of use for understanding and treating tumors. The present work aimed to produce a transgenic tumor lineage with stable expression of a probe that is able to respond to the activity of AMPK, detectable by FRET, from the development of a transposable vector. This vector was built from a molecular subcloning that joined the probe insert to the chromosomal insertion machinery backbone of the piggyBac system. The result of this production provides a new alternative for the analysis of the relation of the role of AMPK within tumoral survival, since it can be done in the long term, due its stable expression, and at the single cell level.

Keywords: Cancer. AMPK. FRET. PiggyBac. Transposon. Single cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>The Hallmarks of Cancer</i>	13
Figura 2 – <i>AMPK Signaling</i>	18
Figura 3 – <i>Schematic Representation of AMPKAR Construct</i>	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Thr	Treonina
CFP	Proteína fluorescente, do inglês <i>cyan fluorescent protein</i>
YFP	Proteína fluorescente, do inglês <i>yellow fluorescent protein</i>
pcDNA3	Backbone do vetor de expressão mamífero, contendo um promotor CMV
DMEM	Meio de cultura celular sintético para cultura de tecidos, do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
SFB	Soro fetal bovino, suplemento para meios de cultura celular
PEI	Polietilamina
BSA	Albumina sérica bovina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , bactéria bacilar gram-negativa
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
SOC	Sigla para <i>super optimal broth with catabolite repression</i> , meio de cultura bacteriano usado para a transformação de células competentes
LB	Sigla para <i>lysogeny broth</i> , meio de cultura bacteriano

LLOX	Sigla para Lentilox, vetor plasmidial
amp	Sigla para ampicilina
PBase	Sigla para o vetor plasmidial que carrega o gene de expressão da enzima transposase do sistema piggyBac

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Reprogramação metabólica em células tumorais.....	14
1.2 A quinase ativada por AMP (AMPK).....	16
1.2.1 Mecanismo de ativação da AMPK.....	17
1.2.2 AMPK e o câncer.....	18
1.3 AMPKAR.....	20
1.3.1 Quantificação por <i>Föster Ressonance Energy Transfer</i> (FRET).....	21
1.3.2 <i>Sensitized emission</i> como método de quantificação.....	22
1.3.3 O AMPKAR como um vetor pcDNA3.....	23
1.4 Sistema <i>piggyBac</i>.....	23
1.5 A análise a nível de <i>single cell</i>.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Justificativa.....	27
2.2 Objetivo Geral.....	27
2.3 Objetivos Específicos.....	27
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
Produção de linhagem tumoral com expressão estável de marcador da atividade da AMPK para análise temporal em células únicas.....	29
<i>Highlights</i>	29
Resumo.....	29
Introdução.....	30

Materiais e métodos.....	32
Resultados.....	36
Discussão.....	41
Referências.....	45
Material suplementar.....	49
4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	52
5. REFERÊNCIAS DO TEXTO PRINCIPAL.....	53
6. ANEXOS.....	60
6.1 Anexo A - Normas de publicação para a revista Elsevier Methods.....	60

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), só em 2018, foram diagnosticados mundialmente 18.078.957 novos casos de câncer, com 9.555.027 mortes reportadas, correspondendo a uma porcentagem de 52,8% do total e sendo a segunda principal causa de morte no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (IHME, Global Burden of Disease). Por conta dessa relevância clínica, as neoplasias englobam uma área de estudo muito forte e sólida na pesquisa científica, onde cada vez mais se descobrem novas maneiras de tratamento e prevenção, compreendendo o envolvimento de mecanismos moleculares específicos no processo da tumorigênese e na resistência celular, responsável pelos casos de reincidência após o tratamento.

Foi proposto em 2000, e revisado em 2011, que as células, durante o processo de tumorigênese, dependem da aquisição de dez capacidades biológicas que tornam possível a sobrevivência de um tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011), como ilustrado na Figura 1. Isso inclui, entre outras, o importante papel da reprogramação do metabolismo energético celular, de forma a sustentar a proliferação exacerbada e o crescimento celular contínuo que não ocorrem em células saudáveis.



Figura 1. *The Hallmarks of Cancer*. Ilustração das dez capacidades biológicas propostas necessárias para o estabelecimento do processo de tumorigênese. **Fonte:** Hanahan and Weinberg, 2011. Adaptado.

Esse conceito apresenta a ideia da substituição do modo de operação normal que existe em células saudáveis, já otimizado e suficiente para atender às demandas energéticas celulares, por um modo de operação peculiar e específico, encontrado nas células tumorais. Esse conceito é posto como uma etapa de aquisição necessária para que a célula tumoral emergente consiga seguir seu rumo em direção ao desenvolvimento e sobrevivência, acompanhada de todos os outros aspectos complexos que tornam possível que uma anomalia seja capaz de trapacear as estratégias evolutivamente conservadas que um organismo saudável tem de evitar que isso aconteça. Além disso, essa ideia ainda reforça a descoberta do Efeito Warburg, quando primeiro foi observada a preferência de obtenção de energia em células tumorais pelo uso da via glicolítica, ao invés do uso da cadeia respiratória mitocondrial, mesmo em condições de normóxia (WARBURG, O., WIND, F., & NEGELEIN, 1927), uma observação totalmente oposta ao comportamento que ocorre em células saudáveis (NELSON; COX, 2014, p. 555).

1.1 Reprogramação metabólica em células tumorais

A glicose é o principal macronutriente usado no processo de obtenção de energia em forma de ATP, a partir da oxidação das suas ligações de carbono. Esse é um processo refinado e de extrema importância, sendo observado em todas as formas de vida da classe dos Mamíferos. Células normais em condições aeróbicas convertem a molécula de glicose no fim da via glicolítica a piruvato, que, em sequência, é majoritariamente convertido em Acetil-CoA e direcionado à mitocôndria para participar do Ciclo de Krebs, onde é oxidado a duas moléculas de CO₂ através de uma série de reações que levam ao fornecimento de prótons para Cadeia Transportadora de Elétrons. Esse caminho é o mais optado a ser seguido porque, no fim, a via glicolítica sozinha não é tão vantajosa em termos de obtenção de energia quando comparada ao processo posterior de oxidação que ocorre dentro da mitocôndria. O saldo líquido de ATP a partir da via glicolítica é de apenas 2 moléculas, enquanto que o resultado obtido com a oxidação completa de glicose em CO₂, em condições ideais, é de 36 moléculas de ATP por molécula de glicose (NELSON; COX, 2014, seq. 14.1). Em situações anaeróbicas, as células normais dão preferência à glicólise e pouco piruvato é direcionado à mitocôndria, optando-se pelo processo de fermentação láctica, na qual o piruvato é reduzido a lactato, pela necessidade de reciclagem das moléculas de NADH em NAD⁺.

A observação a respeito da preferência de obtenção de energia, feita pelo Dr. Otto Warburg em meados de 1920 (WARBURG, O., WIND, F., & NEGELEIN, 1927), mostrou que as células tumorais, mesmo na presença de oxigênio, preferem converter suas moléculas de piruvato a lactato do que participar de todo o processo de oxidação da molécula de glicose, um padrão metabólico que foi chamado de “glicólise aeróbica”, e que possui um critério completamente controverso devido ao déficit energético recorrente (LIBERTI; LOCASALE, 2016).

É importante levar em consideração que o Efeito Warburg só descreve parcialmente o metabolismo tumoral, visto que nem todos os tumores o apresentam. Existem estudos mostrando a heterogeneidade entre tumores, onde alguns apresentam majoritariamente o fenótipo glicolítico enquanto outros mantêm predominantemente a utilização de fosforilação oxidativa (WILDE et al., 2017). Alguns deles, inclusive, se adaptaram a novas estratégias de sobrevivência, como o chamado “Efeito Warburg Reverso”, que corresponde a uma dinâmica na qual as células do estroma são induzidas pelas células tumorais a realizarem o processo de glicólise aeróbica e a transferirem seus subprodutos, não obtidos com a glicólise anaeróbica, a essas células para a posterior utilização no ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (PAVLIDES et al., 2009).

Essa primeira observação a respeito da glicólise aeróbica levou a pesquisas que começaram a notar diferentes estratégias adotadas pelas células tumorais envolvendo sua reprogramação metabólica, de modo a sobreviver a esse déficit energético. Algumas dessas estratégias incluem o aumento significativo da captação de glicose pelas células a partir do aumento da expressão dos transportadores de glicose (GLUTs) presentes na membrana plasmática, uma característica comum e frequente em vários tipos tumorais e que acabou sendo, inclusive, utilizada estrategicamente em exames de diagnóstico, que contam com a captação exacerbada de moléculas de glicose marcada com isótopos radioativos ($[^{18}\text{F}]$ -FDG) no foco tumoral (JONES; THOMPSON, 2009). Além disso, outros processos relacionados ao metabolismo energético estão envolvidos, como a via glutaminolítica, a via das pentoses-fosfato, biogênese mitocondrial, ativação de oncogenes, síntese de lipídeos e a suprarregulação de enzimas, como ocorre, por exemplo, com a lactato desidrogenase A (LDHA) (PAVLIDES et al., 2009).

Alguns estudos também indicam que a fermentação láctica é um indutor da capacidade de invadir tecidos, traço presente em tumores malignos. Isso porque a secreção de lactato resulta em um potencial benéfico relacionado à acidose presente no estroma, de forma que uma invasão mediada pela presença de um pH mais ácido sugere que os íons H^+ secretados pelas células tumorais que liberam lactato se difundem no microambiente tumoral e alteram o estroma e as células adjacentes. Dessa forma, aumenta-se a capacidade de invasão em decorrência de alguns aspectos, como a também consequente diminuição de glicose disponível aos linfócitos infiltrantes de tumores, resultando na perda da eficiência da sua função, que é a eliminação do foco tumoral (LIBERTI; LOCASALE, 2016).

Apesar das mais variadas teorias a respeito dos motivos pelos quais as células tumorais mantêm esse padrão de diferença, sendo encontrado em vários tipos celulares, grande parte delas envolvem a ideia de que essas características são obtidas com o intuito de dar suporte ao processo anormal de crescimento e biogênese na qual essas células se submetem.

1.2 A proteína quinase ativada por AMP (AMPK)

A proteína quinase ativada por AMP, mais conhecida como AMPK, é um complexo proteico heterotrimérico composto por uma região catalítica (α) e duas regiões regulatórias (β e γ) que possui um papel importante como sensor energético em uma via de sinalização que tem como função principal regular a homeostase energética celular (FAUBERT et al., 2015).

A sua principal regulação é feita pelos níveis intracelulares de AMP, de forma que essa molécula se comporta como um agonista da enzima e a atividade da AMPK é proporcionalmente regulada pelo aumento dos níveis da razão AMP/ATP. Ou seja, situações de estresse metabólico no qual ocorre a diminuição da disponibilidade de ATP, como privação de glicose ou hipóxia, fazem com que a AMPK, fosforilada no seu resíduo Thr-172, permaneça ativa ao interagir com a molécula de AMP (HARDIE, 2011; HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012). A AMPK influencia os níveis de ATP disponíveis ao promover cascatas de sinalização que favorecem reações catabólicas, como o processo de autofagia e a oxidação de ácidos graxos, e inibem reações anabólicas que consomem ATP, como os processos de biossíntese e proliferação celular, de forma a conservar a homeostase energética e evitar catástrofes metabólicas que levam a desfechos irreversíveis como a morte celular (FAUBERT et al., 2015).

1.2.1 Mecanismo de ativação da AMPK

A regulação da AMPK em resposta aos níveis energéticos intracelulares envolve a continuidade de seu estado ativo a partir de uma alteração na sua disposição estrutural, dependendo da sua interação com as suas respectivas quinases e fosfatases. Ela é catalisada por três quinases principais (AMPKKs) que respondem a distintos estímulos: a quinase B1 do fígado (LKB1), a proteína quinase dependente de cálcio (CaMKK β) e a quinase ativada por TGF- β (TAK-1); e sua inativação é feita a partir da desfosforilação desse mesmo resíduo pelas fosfatases PP2C e PPM1E (LI et al., 2015).

A estrutura da AMPK consiste na sua subunidade γ sendo capaz de se ligar nas moléculas AMP, ADP e ATP, e interagindo diretamente com as outras duas subunidades α e β ; sendo o resíduo Thr-172 contido na subunidade α . Uma vez fosforilada, pela ação das AMPKKs, sua ativação é regulada pela ligação das adenosinas à subunidade γ : AMP e ADP, uma vez ligadas ao sítio CBS3 da subunidade γ , bloqueiam o acesso das fosfatases no resíduo Thr-172 da subunidade α -1. Se existe ATP ligado à subunidade γ , o acesso das fosfatases ao resíduo Thr-172 permanece livre e ela pode ser inativada. Além disso, a ligação de AMP e, em menor quantidade, de ADP ao sítio CBS3, estimula a fosforilação do resíduo Thr-172 pelo LKB-1 quando a subunidade β está miristoilada. Quando existe a ligação apenas de AMP ao sítio CBS1 da subunidade γ , o aumento da atividade da AMPK é ainda mais induzido. Dessa forma, ocorre o controle alostérico da ativação da AMPK, seguindo a razão ATP/ADP/AMP que existe dentro da célula e que reflete na disponibilidade energética, resultando na sua ativação quando a razão ATP/AMP é baixa, e na sua inativação quando a razão ATP/AMP é alta (CARLING et al., 2011; JEON, 2016). Junto da regulação alostérica como um componente importante na sua ativação, a molécula de AMP também pode ser dita como um regulador a nível fisiológico da AMPK, uma vez que a AMP é 10 vezes mais potente ao inibir a desfosforilação do resíduo Thr-172 do que a molécula de ADP. Além disso, é capaz de induzir uma ativação alostérica maior que 10 vezes mesmo em concentrações intracelulares menores que apenas 2 ordens de magnitude em relação ao ATP, mostrando que o mecanismo de homeostase energética feito pela AMPK é extremamente sensível e refinado (GOWANS et al., 2013).

Além disso, a regulação da atividade da AMPK também só é possível graças à atividade da adenilato quinase (ADK), a enzima que catalisa a interconversão entre as moléculas de AMP,

ADP e ATP. Normalmente, usando o tecido muscular de exemplo, existe uma concentração basal de ATP que é de 7 a 10 vezes maior que a de ADP, e podendo chegar até 100 vezes maior que a de AMP (BEIS; NEWSHOLME, 1975).

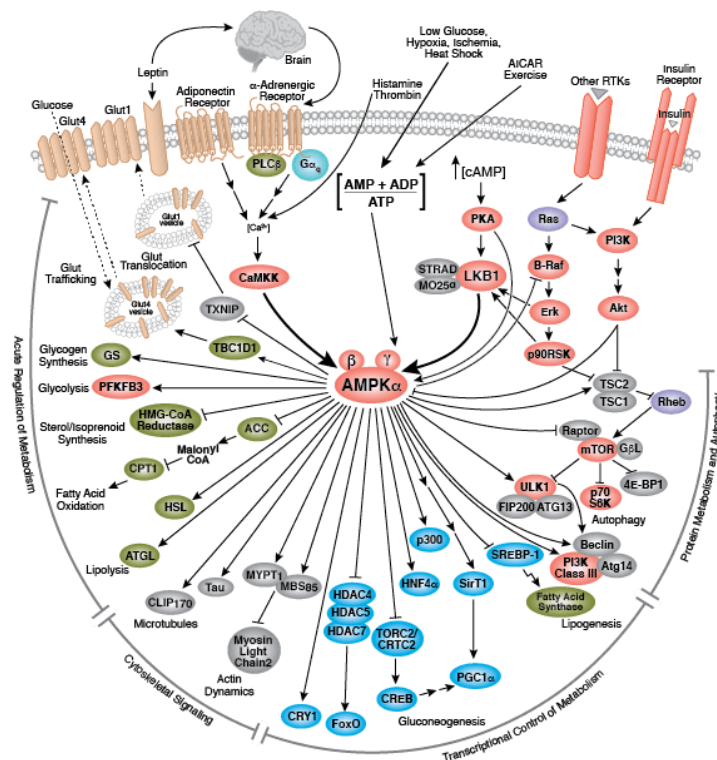


Figura 2. **AMPK Signaling**. Ilustração da via de sinalização da enzima AMPK. **Fonte:** Cell Signaling Technology, 2020.

1.2.2 AMPK e o câncer

Além da sinalização extracelular que as células mamíferas recebem pelo ambiente, a regulação da proliferação e do crescimento celular também são crucialmente regidos pela sinalização intracelular. Isso ocorre através da modulação da atividade de proteínas quinases envolvidas nos processos metabólicos e que possuem ativação dependente da disponibilidade de nutrientes, como a AMPK, que procura a restauração da homeostase energética a partir de mudanças compensatórias na regulação metabólica, via indução de catabolismo.

Devido à via de sinalização na qual a AMPK está inserida (Figura 2), a enzima encontra-se, além de tudo, no meio de uma rede regulatória supressora tumoral que está relacionada com

o controle do crescimento tumoral em resposta ao estresse, uma vez que ela é fosforilada por LKB1, um supressor tumoral, na maior parte das situações (LUO; ZANG; GUO, 2010), e possui também como alvo outros supressores tumorais, como o p53 e TSC2 (FAUBERT et al., 2015).

Além disso, em situações de estresse metabólico ou pela sua ativação farmacológica, a AMPK é capaz de atuar sobre algumas vias importantes relacionadas com o crescimento celular, incluindo a antes citada p53 e mTOR, e tendo influência sobre a regulação de alguns processos como o *checkpoint* de ciclo celular, polaridade celular, senescência e apoptose (LUO; ZANG; GUO, 2010).

A via de sinalização da mTOR compreende a regulação do processo de autofagia, o que faz também com que a AMPK esteja diretamente relacionada com o controle da ativação desse mecanismo. A ativação da mTOR promove o crescimento celular indiretamente ao inibir a autofagia e é interessante observar a influência da AMPK sobre o processo de autofagia uma vez que ele tem um papel muito importante dentro da evolução tumoral (ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011). A autofagia corresponde a um processo no qual vesículas formadas por dupla membrana, os autofagossomos, capturam organelas danificadas ou proteínas mal dobradas e se fundem aos lisossomos para a degradação e reciclagem desses componentes. Esse processo ocorre como adaptação à escassez de nutrientes e também em resposta ao desenvolvimento, morte celular e à supressão tumoral, fazendo com que esse seja um mecanismo essencial para manter a homeostase energética, promover crescimento e ainda promover proteção à célula contra proteínas danificadas, toxinas e patógenos (YUN; LEE, 2018).

A modulação da autofagia possui um papel duplo dentro da supressão e promoção tumoral. Levando em consideração que defeitos no processo autofágico estão associados ao dano genômico, estresse metabólico e tumorigênese, alguns estudos indicam que, na verdade, a autofagia possui um papel tanto na iniciação do processo tumoral quanto na sua inibição, sendo considerada como uma possível ferramenta no tratamento de câncer (GEWIRTZ, 2014; ROSENFELDT; RYAN, 2011). O processo autofágico quando reduzido impede a degradação de componentes e proteínas danificadas em células sob estresse oxidativo, o que pode levar ao desenvolvimento de câncer (YUN; LEE, 2018). Como a AMPK regula diretamente mTOR, pode-se considerar que ela contribui para a supressão da iniciação tumorigênica ao induzir a autofagia.

Por esses motivos e por estar envolvida com esse processo de resistência celular ao estresse, a AMPK, então, é bastante associada com a dinâmica de desenvolvimento tumoral, e a correlação da sua atividade como um potencial supressor tumoral vem ganhando destaque na literatura. O seu protagonismo dentro do estudo da progressão tumoral é cada vez mais considerado, sendo citada em estudos que a indicam até mesmo como regulador negativo do Efeito Warburg (FAUBERT et al., 2013; PINTER, 1982).

Seguindo esse contexto, a indução da ativação de AMPK poderia ser usada de forma a atenuar processos tumorais, uma vez que ela pode estar inibida em alguns tumores que possuem mutações com perda de função no gene da proteína LKB1, como ocorre nos casos de síndrome de Peutz–Jeghers (MIHAYLOVA; SHAW, 2011), um transtorno genético autossômico dominante caracterizado pelo aparecimento de pólipos hamartomatosos, correspondentes a um crescimento benigno do tecido diferenciado, que ocorrem no trato gastrointestinal e são um fator de risco para o desenvolvimento de adenocarcinomas gastrointestinais. Além disso, mutações somáticas no gene da proteína LKB1 também são encontradas em outros tipos tumorais, como em adenocarcinomas pulmonares, carcinomas de células escamosas, carcinomas cervicais e outros (LUO; ZANG; GUO, 2010).

Alguns estudos em modelos de camundongos demonstram que a deleção heterozigótica do gene da proteína LKB1 aumenta a incidência de tumores no estômago e intestino (DARIO R. ALESSI, KEI SAKAMOTO, 2005) e que a deleção tecido-específica desse gene no tecido epitelial de camundongos fêmeas e machos resulta, respectivamente, na aparição de adenocarcinomas endometriais e de próstata (CONTRERAS et al., 2008; PEARSON et al., 2008). Além disso, linhagens de células tumorais de pulmão, deficientes do gene da proteína LKB1, também apresentam atividade suprimida de AMPK enquanto que outras linhagens que apresentam o gene da proteína LKB1 *wild type* demonstram a habilidade do AMPK de inibir o crescimento celular quando o gene é expresso (CARRETERO et al., 2007; XIANG et al., 2004).

1.3 AMPKAR

No ano de 2011 foi criada uma sonda-repórter geneticamente codificada, chamada de AMPKAR, que é capaz de responder à fosforilação causada diretamente pela AMPK, dependente das subunidades catalíticas AMPK α -1 e AMPK α -2, permitindo assim a análise e o monitoramento espaço-temporal da atividade dessa enzima em células únicas vivas (TSOU et

al., 2011). Esse repórter fluorescente consiste de um par FRET de CFP (ECFP) e YFP (Venus), que agrupa um domínio FHA1 (domínio de ligação fosfotreonina), e uma “ponte” proteica que carrega uma sequência consenso para a fosforilação específica pela AMPK. Dessa forma, quando há presença de AMPK ativa, o sítio substrato da estrutura será fosforilado, resultando em uma alteração conformacional que aproxima CFP (doador) de YFP (aceptor) e que pode ser detectada por uma mudança na transferência de energia quantificada por FRET (Figura 3). Dessa forma, é possível acompanhar a dinâmica de resposta celular a nível de fosforilação e, por consequência, da ativação da AMPK, o que torna viável a análise da resposta ao estresse energético tumoral na escala de células únicas vivas (TSOU et al., 2011).

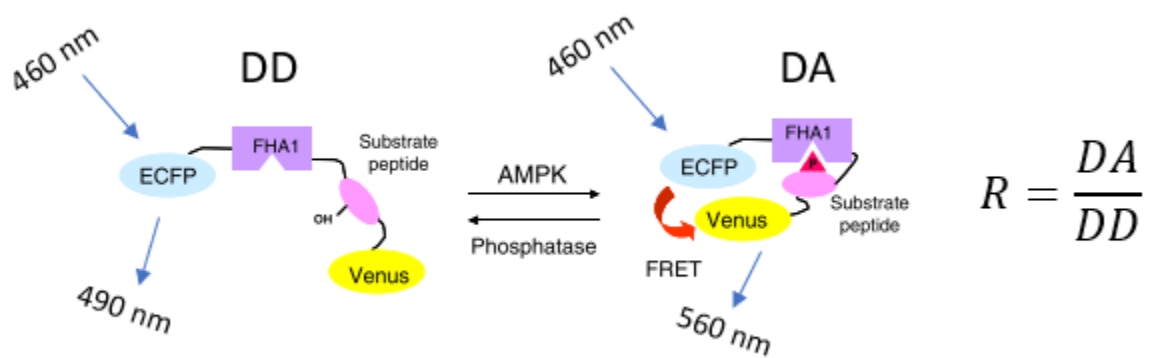


Figura 3. **Schematic Representation of AMPKAR Construct.** Imagem ilustrando a representação esquemática da do repórter AMPKAR. **Fonte:** TSOU et al, 2011. Adaptado.

1.3.1 Quantificação por *Föster Resonance Energy Transfer* (FRET)

Uma maneira de analisar a resposta de células quanto a alterações na atividade enzimática, como foi feito no caso do AMPKAR, é pela metodologia *Föster Resonance Energy Transfer* (FRET). O princípio do FRET consiste na transferência de energia de um fluoróforo doador em um estado excitado a um fluoróforo aceptor, através de um acoplamento dipolo-dipolo não radioativo. Isso resulta no aumento da emissão de fluorescência da proteína fluorescente aceptor e uma diminuição da emissão de fluorescência da doadora, de forma que a eficiência da transferência de energia do FRET está relacionada com a redução da distância entre as duas proteínas (ELDER et al., 2009). A distância na qual ocorre metade do percentual da eficiência de transferência de energia por ressonância, a qual é chamada de distância Foster, é descrita como em torno de 20 a 60 Å (LAKOWICZ, 2006, p.444). Além disso, é necessário

que o espectro de emissão da proteína doadora se sobreponha ao espectro de absorção da proteína receptora para que a transferência de energia do FRET ocorra (WEIGEL, 2017).

O uso dessa ferramenta permite a análise direta de interações dinâmicas entre proteínas que possuem papéis regulatórios importantes em determinadas vias de sinalização, graças à concepção de um constructo proteico formado por um par de fluoróforos, fusionados ou não, responsivos à interação com moléculas envolvidas em vários aspectos da sinalização intracelular, o que os torna capazes de agir como biossensores. Dessa forma, essa ferramenta pode ser usada para a análise e quantificação de várias situações, como a visualização de processos interativos proteína-proteína, a dinâmica conformacional das moléculas e a análise do ambiente molecular (STROHHÖFER et al., 2011).

1.3.2 *Sensitized emission* como método de quantificação

O FRET é uma metodologia que não pode ser medida diretamente, pois ela não é diretamente observável. Contudo, ele pode ser inferido a partir da alteração das suas propriedades fotofísicas. Existe mais de um tipo de cálculo possível para a quantificação de FRET usando microscopia, que é adequado para cada tipo de experimento. Os métodos de quantificação possuem uma proporção de acurácia e complexidade, onde quanto maior for a exatidão do cálculo, maior é a dificuldade de realiza-lo, necessitando de situações experimentais específicas e até limitando o uso do FRET, em último caso, à quantificação unicamente em células mortas (BASTIAENS, 2012).

No caso do vetor AMPKAR é possível utilizar a quantificação pela razão *Ratio Imaging*, que é a do tipo mais simples e é apenas qualitativa, dada pela razão apresentada na Figura 3, onde DA corresponde à excitação do doador e quantificação de emissão do acceptor, e DD corresponde à excitação do doador e quantificação de emissão do doador. O que é, basicamente, a razão da quantificação de emissão de cada um dos canais a partir da excitação do fluoróforo doador (no caso da AMPKAR, o CFP), levando em consideração que, quando há FRET, a quantificação de emissão do doador é diminuída, enquanto a intensidade do acceptor é aumentada por emissão sensibilizada (do nome *sensitized emission*), em decorrência da transferência de energia (BROUSSARD et al., 2013). O *Ratio Imaging* pode ser utilizado na situação do AMPKAR levando em conta que esse tipo de quantificação só funciona quando o fluoróforo doador e o fluoróforo acceptor estão no mesmo polipeptídeo. Isso porque ocorre uma

sobreposição dos comprimentos de onda, causando uma excitação direta do acceptor e uma emissão direta do doador, e é necessário manter a estequiometria entre doador e acceptor constante em cada pixel que for quantificado. Além disso, o *Ratio Imaging* conta com a vantagem de ser facilmente implementado e por isso pode ser realizado em configurações confocais, e é rápido e simples pela necessidade de aquisição de apenas duas imagens (BASTIAENS, 2012).

Esse cálculo pode ser feito manualmente ao quantificar a emissão de fluorescência nas duas condições, mas resulta em uma inferência menos precisa. A melhor escolha é fazer uso de *scripts* desenvolvidos para a automatização desse processo, que levam em conta parâmetros de correção da imagem, como a intensidade do *background* e ruído, que contribuem no aumento de uma intensidade que não é consequência direta do sinal do FRET.

1.3.3 O AMPKAR como um vetor pcDNA3

O repórter AMPKAR é disponibilizado (Addgene #35097) à comunidade científica como um vetor de expressão plasmidial pcDNA3, porém esse tipo de vetor está limitado à metodologia de transfecção simples. Essa metodologia se refere à introdução proposital de material genético dentro das células sem que este se integre ao seu genoma, fazendo uso de reagentes que facilitam a passagem da molécula de DNA pela membrana citoplasmática. A transfecção de vetores sem regiões de integração cromossomal tem como principal limitação a análise ao longo do tempo, pois isso resulta em plasmídeos não integrados que acabam sendo degradados, diferente do que ocorre em outros tipos de vetores, como os lentivirais, retrovirais ou transposons. Por esse motivo, fez-se necessário neste trabalho a adaptação do repórter AMPKAR em um tipo de vetor que possua integração cromossomal, de forma a avaliar a atividade da enzima AMPK ao longo do tempo.

1.4 Sistema *piggyBac*

Os transposons, ou elementos de transposição, são elementos genéticos móveis, que transportam informações genéticas não essenciais, e são frequentemente associados ao processo de compartilhamento de DNA plasmidial entre bactérias, chamado de transferência gênica horizontal, de forma a partilhar genes que conferem vantagens seletivas. Os transposons possuem mobilidade e são capazes de saltar de uma região à outra do genoma

com facilidade, e isso pode variar de elemento para elemento, com diferentes mecanismos e sequências (KAMINSKI, 2015).

Um tipo de transposon usado na integração genômica em células eucarióticas é o sistema *piggyBac*, que possui um mecanismo de “recorte e cola” entre vetores e cromossomos. O sistema *piggyBac* é composto por um plasmídeo, formado por um *backbone* contendo a maquinaria de transposição e a sequência do gene interesse, e que depende da ação da enzima transposase, que também é inserida em forma de plasmídeo (as sequências de expressão para o *backbone* e para enzima podem estar no mesmo plasmídeo ou não). A transposase é capaz de transferir a sequência de DNA de interesse do plasmídeo para uma das várias regiões TTAA distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma, ao reconhecer e clivar no vetor plasmidial as chamadas *inverted terminal repeated sequencies (ITRs)*, que são transposon-específicas, e estão localizadas nas duas extremidades que flanqueiam a sequência de interesse. Dessa forma, a enzima é capaz de clivar o vetor ao redor da sequência de interesse e torná-la livre do seu sítio original, de forma que ela possa ser integrada no genoma, permitindo a criação de uma linhagem celular transgênica com expressão estável (SYSTEM BIOSCIENCES, 2014).

O *piggyBac* acaba sendo uma opção vantajosa uma vez que a inserção do AMPKAR no plasmídeo do transposon pode ser feita por uma subclonagem usando enzimas de restrição. Além disso, a integração genômica feita por transposon traz consigo outras vantagens quando comparada aos sistemas de expressão de vetores virais, como ser capaz de transferir insertos maiores (>200kb) e intactos, sem a ocorrência de possíveis quebras de fita dupla; diminuição das chances de mutações causadas por inserções aleatórias, uma vez que a integração direta do sistema é feita apenas em sítios TTAA; maior eficiência, pois existe um maior controle sobre o número de cópias integradas, a partir da titulação entre as razões transposase/transposon, onde altas proporções de transposase resultam em um maior número de integrações; uma integração totalmente reversível e uma excisão que não resulta em consequências ou mutações; e, finalmente, maior segurança devido à ausência de componentes virais (SYSTEM BIOSCIENCES, 2014). Apesar disso, por ser um sistema de integração por recorte e cola, ainda existe o risco de possível mutagênese por inserção e instabilidade genômica. Ademais, também existe a possibilidade da integração genômica do *backbone*, como ocorre com frequência no caso da linhagem HEK-293. Porém, como essa linhagem possui uma alta taxa de integração basal, não se sabe se esse tipo de fenômeno é

cl clinicamente relevante em outros tipos de linhagem, como linhagens de células renais ou de linfócitos T (WILSON; WOODARD, 2015). Ainda existem poucos estudos frisando quais são os riscos envolvidos na transposição usando esse tipo de sistema e quais seriam seus efeitos genômicos indesejados, portanto, a questão a respeito da frequência desse problema e quais as suas maiores desvantagens ainda não está bem esclarecida.

Em 2015, Saha *et al.* avaliaram os possíveis efeitos genômicos indesejados causados pelo sistema *piggyBac* e mostraram que as sequências endógenas presentes no genoma de células da linhagem HEK-293 semelhantes aos componentes do sistema não foram suficientes para mediar o processo de transposição nem mobilização genômica. Isso contraria a hipótese de que a transposase seria capaz de reconhecer e clivar sequências endógenas semelhantes às das ITRs e regiões contendo o segundo sítio de clivagem mais comum, o CTAA, o que resultaria em possível instabilidade genômica (SAHA *et al.*, 2015).

1.5 A análise a nível de *single cell*

O comportamento heterogêneo dentro de uma população que possui a mesma constituição genética é um fenômeno presente em diversos contextos biológicos e mesmo células sob as influências do mesmo ambiente podem responder de formas diferentes. A análise populacional se baseia na observação de uma grande quantidade de células que possuem comportamentos individuais e na determinação da distribuição em que essas respostas aparecem ao longo da população (CARLO; LEE, 2009). Essa distribuição depende da variabilidade da sinalização intracelular entre as células de parentesco próximo e das diferenças de etapa em estados regulatórios como ciclo celular ou de diferenciação (REYES; LAHAV, 2018).

Dentro do contexto da terapia de câncer, essa heterogeneidade não-genética é o principal causador da variabilidade de resposta aos tratamentos dentro de uma população isogênica. Ela pode levar à morte fracionada e pode anteceder e mediar a evolução de uma possível resistência genética, a qual acaba levando, mais tarde, à falha terapêutica (REYES; LAHAV, 2018). Por isso, a análise da resposta celular a nível individual é extremamente importante, visto que a análise populacional não é capaz de medir as variações fenotípicas que existem individualmente dentro de uma subpopulação e como elas podem levar à sobrevivência desses grupos. A variação da dinâmica de proteínas com papéis regulatórios, como a p53, pode

explicar a morte fracionada em uma linhagem celular tumoral que recebe o mesmo tratamento quimioterápico, revelando, por exemplo, a necessidade dessa célula de atingir um patamar crítico nos níveis de p53 para que haja a ocorrência de apoptose e a chegada ao sucesso terapêutico (PAEK et al., 2016). Além disso, também é possível observar a existência de uma diferença entre os resultados de correlações que são estudadas a níveis diferentes, como, por exemplo, a forte correlação que existe entre a indução de autofagia seguida por senescência a nível populacional, desencadeada pelo dano agudo no DNA, e falta de interdependência direta entre as duas quando observado a nível de células individuais (FILIPPI-CHIELA et al., 2015).

Apesar da evidente importância da análise individual celular e do peso que o papel regulatório da AMPK tem dentro do contexto metabólico das células tumorais, como mostrado nas seções anteriores, ainda é difícil encontrar na literatura pesquisas que foquem na análise específica da atividade da enzima AMPK como contribuinte na determinação do destino das células tumorais a nível de célula individual.

2. OBJETIVOS

2.1 Justificativa

O entendimento do papel da AMPK no câncer ainda não está completo, apesar dos mais diversos estudos, principalmente em relação a possível dualidade dessa proteína. Nesse sentido, o estudo de células únicas, que hoje são inexistentes para atividade de AMPK, pode contribuir para o esclarecimento da dinâmica proteica e como a atuação da enzima pode modular a sobrevivência tumoral. Por isso, o presente trabalho visa criar uma alternativa na análise da atividade de uma enzima que possui um papel de suma importância na homeostase energética celular, a AMPK, permitindo, principalmente, sua avaliação a nível de célula individual única e a avaliação do seu grau de contribuição para a sobrevivência das células tumorais ao longo do tempo.

2.2 Objetivo geral

Estabelecer uma linhagem celular tumoral marcada de forma estável com a marca fluorescente AMPKAR e permitir a análise temporal da dinâmica metabólica a nível de células individuais vivas.

2.3 Objetivos específicos

- Produção do vetor transposon carreador da sequência da AMPKAR;
- Produção da linhagem celular tumoral com expressão estável do repórter AMPKAR;

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Produção de linhagem tumoral com marcação da atividade da enzima AMPK como alternativa para a análise temporal em células únicas” foi formatado conforme [normas de publicação](#) requeridas pelo periódico Elsevier Methods.

Produção de linhagem tumoral com expressão estável de marcador da atividade da AMPK para análise temporal em células únicas

Daphne Tórgo ^[1,2], Luana S. Lenz ^[1,2], Guido Lenz ^{[1,2]*}

¹ Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500 - 91501-970 - Agronomia, Porto Alegre – RS, Brasil.

² Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500 - 91501-970 - Agronomia, Porto Alegre – RS, Brasil.

* Autor correspondente: gulenz@gmail.com

Highlights

- Construção de vetor plasmidial com sequência de expressão para sonda-repórter da atividade da AMPK
- Estratégia de uso do sistema *piggyBac* para inserção cromossomal e expressão estável da sonda
- Quantificação por *Föster Resonance Energy Transfer* tornando viável acompanhar a dinâmica de resposta celular a nível de fosforilação
- Possibilidade de análise da resposta ao estresse energético tumoral na escala de células únicas vivas

Resumo

O desenvolvimento tumoral, dentre todos os seus outros aspectos complexos, depende da adaptação celular à sua própria mudança de comportamento, fazendo com que a reprogramação do metabolismo energético tenha uma importância muito grande nesse processo. A rede de

manutenção da homeostase energética celular conta com o papel de uma quinase que atua como um sensor energético, controlando os processos catabólicos e anabólicos que são necessários para que exista o equilíbrio da razão ATP/AMP: a AMPK. O papel da AMPK acaba se misturando também no campo da tumorigênese, uma vez que ela está diretamente inserida em uma rede de sinalização supressora tumoral, o que faz dela uma potencial estratégia de uso na compreensão e tratamento de tumores. O presente trabalho teve como objetivo a produção de uma linhagem tumoral transgênica com expressão estável de uma sonda-repórter que é capaz de responder à atividade da AMPK, detectável por FRET, a partir do desenvolvimento de um vetor transponível. Esse vetor foi construído a partir de uma subclonagem molecular que uniu o inserto carreador da sonda-repórter ao backbone que carrega a maquinaria de inserção cromossomal do sistema *piggyBac*. O resultado dessa produção disponibiliza uma nova alternativa para a análise da relação do papel da AMPK dentro da sobrevivência tumoral, uma vez que pode ser feita a longo prazo, devido a sua expressão estável, e a nível de células individuais.

Palavras-chave: Câncer. AMPK. FRET. *PiggyBac*. Transposon. *Single Cell*.

1 Introdução

Dentro do processo de desenvolvimento tumoral, é importante levar em consideração que o metabolismo energético e a sua reprogramação possuem um papel muito importante, baseando-se no princípio de que a energética celular em células tumorais está alterada em comparação às células saudáveis, e que essas alterações dão suporte à obtenção de características que estão envolvidas no desenvolvimento de propriedades tumorigênicas, como a proliferação exacerbada e crescimento celular. Isso faz com que as alterações do metabolismo presente em células tumorais sejam consideradas um dos *Hallmarks of Cancer* ^[1], junto de outras 9 capacidades biológicas adquiridas ao longo do processo, que possuem suma importância para a tumorigênese ocorra. Apesar de possuir um papel importante, as alterações metabólicas e o processo de reprogramação energética presentes em tumores ainda não são completamente compreendidos, e as maneiras de explorar essas propriedades visando a resposta celular a nível de célula individual viva também ainda não se fazem predominantes como foco de estudo.

Existe, dentro da rede do metabolismo energético, uma proteína muito importante para manutenção da homeostase intracelular e que está inserida no meio de uma rede de supressão tumoral: a AMPK. Isso porque essa quinase regula e é regulada por supressores tumorais como LKB1, p53, TSC2, o que faz com que ela tenha um papel a ser considerado dentro do estudo da progressão tumoral [13,14]. A AMPK ocupa um papel importante dentro do contexto de reprogramação metabólica, pois além da sua comunicação com proteínas supressoras tumorais, ela também funciona como um sensor energético, uma vez que a atividade dela é regulada pelas razões intracelulares de AMP e ATP, fazendo parte da regulação do processo de resistência celular ao estresse [15, 16]. Quando ela interage com a molécula de AMP, devido a sua alta disponibilidade em decorrência da diminuição de ATP, ela permanece fosforilada e ativa, estimulando vias de sinalização que induzem o catabolismo e inibindo as que induzem o anabolismo [2,3].

Seguindo essa ideia, a indução da ativação de AMPK poderia ser usada de forma a atenuar processos tumorais, uma vez que ela pode estar inibida em alguns tumores que possuem mutações com perda de função no gene da proteína LKB1, como ocorre nos casos de síndrome de Peutz–Jeghers. Além disso, a ativação da AMPK também induz uma reprogramação energética que reforça *checkpoints* metabólicos, atuando em vias de sinalização importantes relacionadas com o crescimento celular, como as vias de p53 e mTOR [4].

Estabelecer uma linhagem com expressão estável de um marcador da atividade da AMPK contribuiria para o estudo do seu papel como um agente antitumoral ao tornar possível a análise do seu comportamento frente aos fármacos envolvidos na modulação de processos metabólicos. Além disso, também seria possível acompanhar se existe a variação de atividade da AMPK em células que recebem proporções diferentes de suprimentos energéticos, como células centrais e células da periferia de um tumor.

A criação de um vetor com expressão estável da AMPKAR tornaria possível a análise dos níveis de ativação da AMPK em células individuais vivas bem como sua influência na flutuação da tolerância de células tumorais clonais. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma linhagem celular tumoral marcada de forma estável com uma marca fluorescente, a partir da criação de um vetor que carrega uma sequência para a expressão de uma sonda-repórter capaz de reportar diretamente a dinâmica intracelular da atividade da AMPK a partir do uso da metodologia FRET, permitindo a inferência da interação entre

proteínas a nível molecular. O resultado dessa produção disponibiliza uma nova alternativa para a análise da relação do papel da AMPK dentro da sobrevivência tumoral, uma vez que pode ser feita a longo prazo, devido a sua expressão estável, e a nível de células individuais

2 Materiais e métodos

2.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens de células A-172 (glioblastoma humano, ATCC CRL-1620) e U-251 (glioblastoma humano, SigmaAldrich) ambas cultivada em DMEM *Low glucose*; e HEK-293T (célula embrionária de rim humana, ATCC CRL-1573) cultivada em DMEM *High glucose*. Todos os meios foram suplementados com 10% de SFB, 1% de solução contendo estreptomicina e penicilina, e 0,1% fungizona; as células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

2.2 Vetor AMPKAR

O vetor plasmidial usado contendo a sequência codificante para o repórter da atividade da AMPK com marcação tipo FRET foi o vetor AMPKAR pcDNA3 (Fig. S1), cedido por Lewis Cantley (Addgene plasmid #35097; <http://n2t.net/addgene:35097>; RRID: Addgene_35097), sendo disponibilizado pela Addgene diretamente em forma de alíquota contendo bactérias *E.coli* já transformadas com o plasmídeo. Foi cultivado e expandido o inóculo contendo as bactérias transformadas em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100 mg/mL, mantidas em estufa a 37°C *overnight*, junto de um controle negativo e um controle positivo. No dia seguinte, o plasmídeo expandido foi purificado usando o kit *PureLink HiPure Plasmid Midiprep* (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante.

Antes de iniciar a clonagem do vetor, foi feita uma validação da atividade do AMPKAR. Após transfecção usando PEI na proporção 1 µg DNA : 3 µL PEI, foi utilizada Ionomicina na concentração 1 µM durante 5 minutos, onde espera-se o pico de atividade da AMPKAR a partir do minuto 3 ^[5]. A atividade foi capturada com microscopia de fluorescência e quantificada através do software Fiji, levando em consideração a razão DD/DA.

2.3 Vetor pB-NTPD5

O vetor plasmidial contendo o backbone para o sistema transposon piggyBac que foi utilizado para a realização deste trabalho (Fig. S2) é resultado de uma subclonagem anteriormente feita usando a sequência codificante do gene ENTPDase 5 (DE CAMPOS, R.P., dados não publicados) a partir de um primeiro vetor que continha a sequência codificante do gene ENTPDase 1, concedido pela Dra. Liziane Raquel Beckenkamp (UFSCPA)^[6], integrante do grupo de pesquisa da prof^a. Dra. Márcia R. Wink (UFSCPA), diretamente em forma de alíquota contendo o plasmídeo.

2.3 Clonagem

Para a digestão de ambos vetores foram utilizadas as enzimas de restrição EcoRI (New England Biolabs) e BglII (New England Biolabs). Foram feitas reações separadas para cada um dos vetores, utilizando o DNA plasmidial na concentração de 1 µg. Ainda, junto foram utilizados NEBuffer 4 (New England Biolabs) e BSA (Invitrogen) em cada reação, corrigidas em 50 µL com H₂O destilada e deionizada. Para ambos os vetores, as amostras foram colocadas no aparelho MyCycler Thermal Cycler System (Biorad) durante 20 minutos a 37°C. Para a desativação da enzima EcoRI, as amostras ficaram no aparelho durante mais 20 minutos a 60°C. Para o vetor pB-NTPD5 também foi feita uma digestão parcial da enzima BglII, na qual, após a adição de BglII na reação com a EcoRI já inativada, as amostras ficaram a 37°C no aparelho durante 5 minutos e 15 minutos.

Para a ligação dos fragmentos de DNA plasmidial, foram utilizadas as concentrações de 9 fmol de DNA do inserto AMPKAR e 3 fmol de DNA do vetor pB-NTPD5, juntamente com *Buffer* Ligase (Invitrogen) e 1U de Ligase T4 (Invitrogen), corrigidos em 20 µL de H₂O destilada e deionizada.

Para a separação de todos os fragmentos foi usado gel de agarose 0,8% (Kasvi) em uma cuba de eletroforese (Biorad) usando tampão TBE 0,5x. Foi feito mix na proporção 0,5 µL *loading* (Invitrogen) : 1 µL *saber* (Invitrogen) : 2 µL *ladder* (Invitrogen) e 10 µL de cada alíquota de interesse. Para a purificação de todos os produtos separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% foi utilizado o kit *PureLink Quick Gel Extration and PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante no protocolo *Purifying DNA from Gels Using a Centrifuge*.

2.4 Transformação de bactérias

Bactérias *E.coli* foram transformadas por choque térmico, utilizando a proporção de 100 ng DNA para 50 μ L de bactérias competentes mantidas a -80°C . A amostra foi posta em banho seco a 42°C durante 1 minuto e posta imediatamente após em gelo durante mais 2 minutos. A alíquota foi colocada em 1 mL de meio SOC e deixada de 1h-2h no shaker a 37°C .

As bactérias transformadas foram plaqueadas por esgotamento em meio LB sólido contendo ampicilina 100 mg/ μ L na proporção 1 μ L amp : 1 mL meio, para a formação de colônias únicas.

2.5 PCR de colônia

De uma colônia de bactérias transformada com o plasmídeo pbAMPKAR foi coletada uma pequena amostra que foi diluída diretamente no mix da reação que continha Buffer PCR 1X (Invitrogen), dNTP 0,2 mM (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM (Invitrogen), sendo 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen) colocada por último no mix. Foi utilizado o par de primers M13 Reverse (GGAAACAGCTATGACCAT) e GFP Foward (AGCAGAAGAACGGCATCAAG), 10 μ M cada, para a amplificação de fragmentos do pbAMPKAR. Como controle foi utilizado o plasmídeo LLOX (Addgene) na concentração 10 ng/ μ L e o par de primers GFP Foward (AGCAGAAGAACGGCATCAAG) e GFP Reverse (CGGTCACGAACTCCAGCA) (10 μ M cada).

2.6 Purificação do pbAMPKAR

Para a extração de DNA plasmidial das bactérias transformadas foi utilizado o kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen), utilizando-se 3 mL de bactérias cultivadas em meio LB líquido com ampicilina e seguindo as instruções do fabricante conforme protocolo. A medição das concentrações de DNA obtidas durante todos os experimentos foi feita usando 1 μ L de amostra no espectrofotômetro NanoDrop da Thermo Scientific.

2.7 Transfecção com Lipofectamina

Células HEK foram plaqueadas em uma placa de 24 poços (15 mil células/poço) em meio DMEM *High glucose*, suplementado com 10% de soro fetal bovino. A transfecção foi feita com os vetores pbAMPKAR, AMPKAR e LLOX na concentração de 250 ng/ μ L de DNA, utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante. O meio foi trocado no dia

seguinte à transfecção, mantendo as células em meio DMEM *High glucose* com 10% de SFB sem a adição de antibiótico ou antifúngico em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

2.8 Transposição com o sistema piggyBac

Células A-172 foram plaqueadas em uma placa de 24 poços (15 mil células/poço) e mantidas com meio DMEM *Low glucose*, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de uma solução de penicilina e estreptomicina e 0,1% de fungizona, com 5% de CO₂. A transposição foi feita utilizando a proporção 1 PBase : 2 vetor, seguindo o mesmo protocolo de transfecção com Lipofectamina. O meio da placa foi trocado após aproximadamente 6 horas, com o mesmo meio suplementado.

2.9 Microscopia óptica de fluorescência

As imagens capturadas por microscopia óptica foram realizadas no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (Departamento de Biofísica, Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, 9500 - 91501-970 - Agronomia, Porto Alegre – RS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, utilizando o microscópio invertido AxioVert 200 com o filtro Green BP^[7] (515-565 nm).

2.10 Microscopia confocal

Células da linhagem U251 foram plaqueadas em uma placa dividida em quatro quadrantes e com uma lamínula fixada ao fundo tratada com 0,1 mg/mL de Polilisina para aderência das células. Foram cultivadas 5000 células em cada divisória e estas foram tratadas com 1µM de Ionomicina durante 5 minutos. As imagens foram capturadas antes e após a adição da Ionomicina, por microscopia confocal realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, situado no Campus do Vale (Av. Bento Gonçalves, 9500 - 91501-970 - Agronomia, Porto Alegre – RS), utilizando o aparelho confocal da marca Zeiss. Foram utilizados os canais azul (~440 nm) e amarelo (~559 nm), com a intensidade de luz e *Dye Setup* (ECPF e EYFP) ajustada pelo técnico responsável pelo aparelho.^[22] As imagens obtidas foram quantificadas usando o software Fiji, onde as células do campo foram contornadas e a média da fluorescência de cada uma foi obtida. Com as médias dos valores das células de cada um dos tempos, foi feita a razão DD/DA.

3 Resultados

3.1 Validação do AMPKAR

Antes da clonagem do vetor, foi feito um teste para a validação da atividade do vetor original da AMPKAR. As células transfectadas foram plaqueadas e tratadas com Ionomicina, um ionóforo de Ca^{2+} que ativa a AMPK a partir do aumento da concentração de cálcio e ativação da $\text{CaMKK}\beta$ [8].

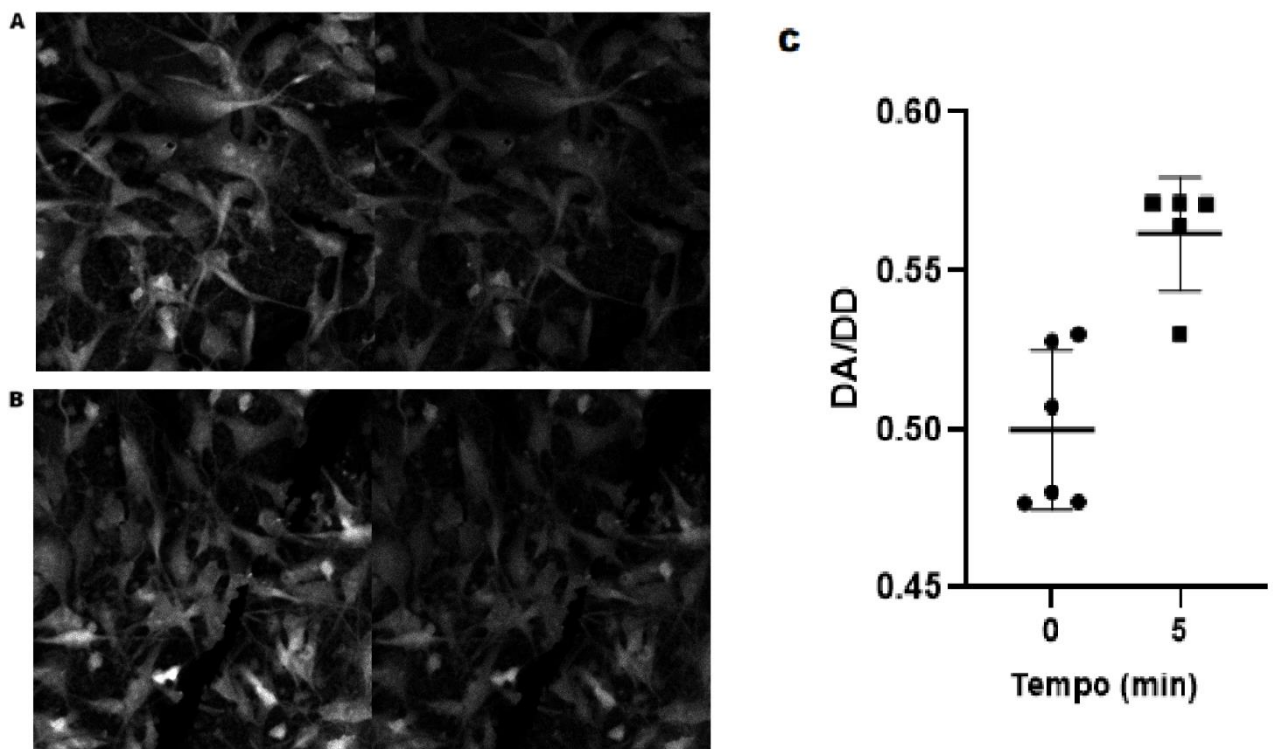


Figura 1. Tratamento com ionomicina no AMPKAR. Imagens capturadas com microscopia confocal. **A**, pré-tratamento com ionomicina das células U251 transfectadas com o vetor AMPKAR no canal de fluorescência azul (esquerda, ~440 nm) e amarelo (direita, ~559 nm). **B**, minuto 5 pós-tratamento com ionomicina 1 μM da mesma linhagem transfectada com o vetor AMPKAR no canal de fluorescência azul (esquerda, 488 nm) e amarelo (direita, 559 nm). **C**, resultado da razão DD/DA entre a emissão dos fluoróforos YPF (acceptor) e CPF (doador) no canal de excitação do doador, antes e após 5 minutos do tratamento com ionomicina 1 μM nas células U251 transfectadas com o vetor AMPKAR. Dados analisados por teste t de Student, apresentando diferença significativa ($p < 0,01$).

O resultado da razão de emissão de fluorescência entre o doador CPF e o acceptor YPF foi feita a partir do cálculo *Ratio Imaging* (DA/DD) e mostrou um aumento dos valores em comparação

entre o momento pré-tratamento e pós-tratamento, como mostra a figura 1, letra C. A média dos valores do momento pré-tratamento foi 0,50 e do momento pós-tratamento foi 0,56 ($p = 0,0013$), indicando a atividade por FRET, uma vez que o aumento da intensidade de emissão do fluoróforo acceptor indica a transferência de energia causada por FRET ^[9].

3.2 Obtenção dos fragmentos

Após a digestão dos vetores e subsequente separação por eletroforese foi possível obter os fragmentos mostrados na Figura S4. A digestão dos vetores mostrou-se bem sucedida uma vez que, no caso do AMPKAR (Fig. S4A, coluna 1), esperava-se um fragmento correspondente à fita de DNA em forma linear que tamanho próximo de 7459pb e dois fragmentos com tamanho próximo de 4518pb e 2941pb, correspondente aos fragmentos maior e menor (inserto), resultantes da clivagem em ambos sítios no vetor.

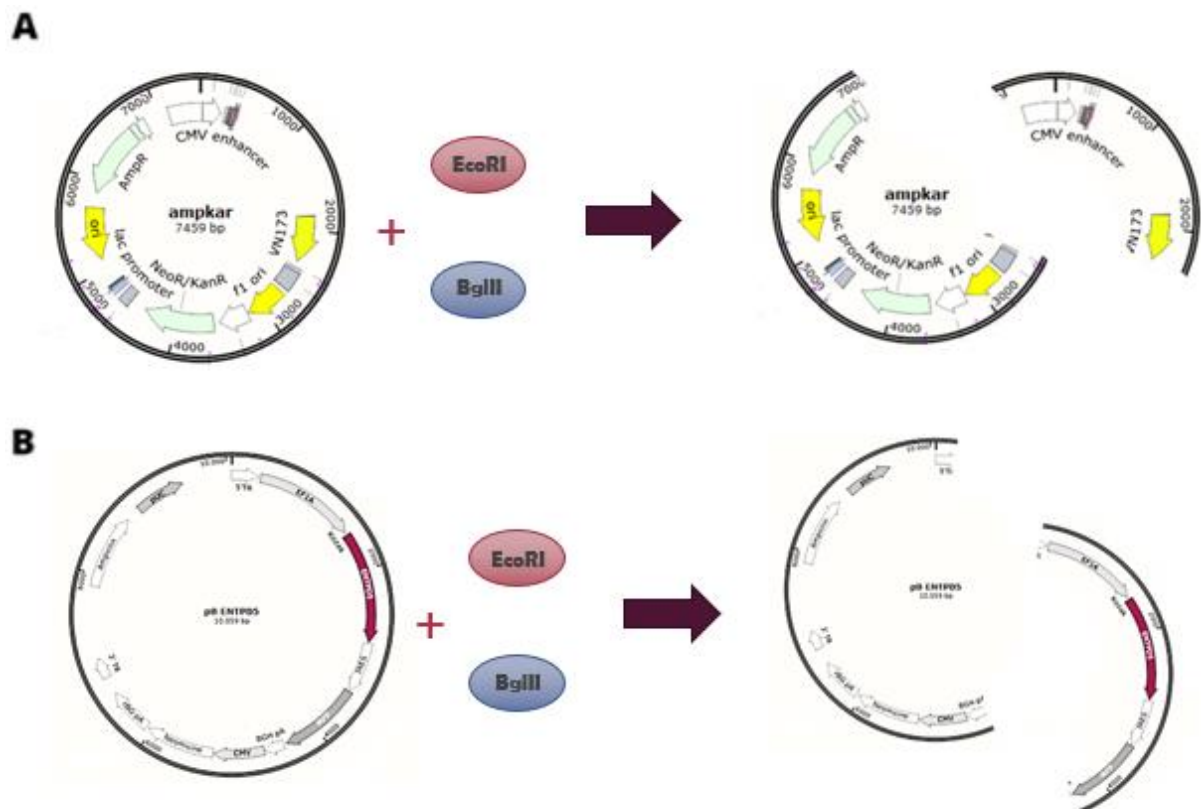


Figura 2. Digestão dos vetores AMPKAR e pBNTPD5. Representação esquemática da digestão dos vetores usando as enzimas de restrição EcoRI e BglII. **A**, digestão do AMPKAR. **B**, digestão do pBNTPD5. Fonte: autoria própria.

No caso do pBNTPD5, era esperado que o fragmento de interesse apresentasse tamanho próximo de 6756pb. O resultado indicou a existência desse fragmento na banda indicada pela seta (Fig. S4A, coluna 2). Essa banda foi recortada e purificada, resultando em uma leitura de 5,9 ng/ μ L. Devido à baixa concentração, foi feita uma digestão parcial para a enzima BglII durante 5 e 15 minutos na tentativa de confirmar a existência do fragmento e obter uma banda mais intensa. A banda resultante presente na mesma altura (Fig. S4B, indicada pela seta) foi recortada e purificada, porém resultou em uma leitura negativa. Por conta deste motivo, foi utilizado o DNA da primeira digestão para fazer a ligação entre os fragmentos, mesmo estando com uma baixa concentração.

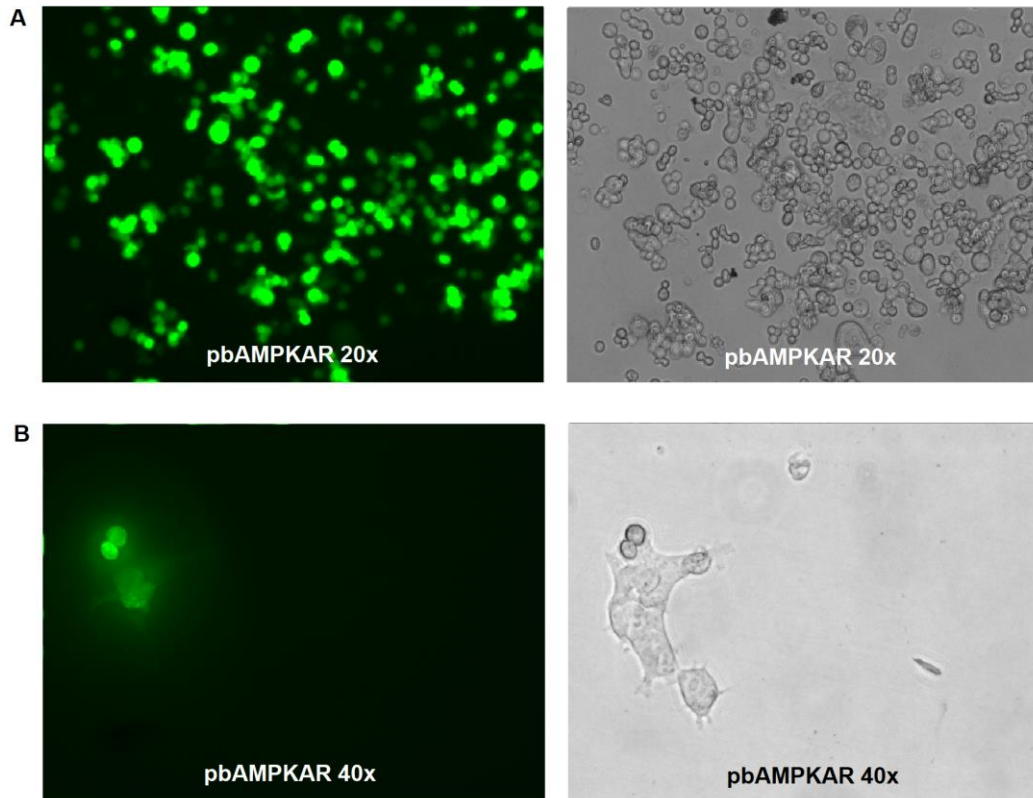
3.3 Validação do vetor

Para confirmar o sucesso da transformação bacteriana e da montagem correta do vetor clonado pbAMPKAR (Fig. S5) foi feito um PCR de colônia. As bactérias transformadas foram esgotadas em uma placa contendo meio LB sólido e ampicilina, o que resultou na formação de uma única colônia, indicando ter recebido o gene de resistência contra ampicilina presente no vetor pbAMPKAR. Desta foi feito um PCR para confirmar se de fato as bactérias haviam sido transformadas (Fig. S5). O resultado correspondente ao vetor foi positivo, levando em consideração que era esperado um de dois possíveis fragmentos, com aproximadamente 4392pb ou aproximadamente 2972pb (presente na Fig. S5, coluna 1). Após a amplificação, a colônia bacteriana foi inoculada em meio LB líquido com ampicilina e o DNA plasmidial foi purificado, resultando em uma concentração de 278,5 ng/ μ L.

3.4 Transfecção do pbAMPKAR

Antes da realização da transposição, foi feita uma transfecção com lipofectamina na linhagem celular HEK para testar se de fato a clonagem do plasmídeo havia sido bem sucedida e se a sonda-repórter do inserto não havia sofrido algum tipo de dano. Foram utilizados, além do pbAMPKAR, o plasmídeo LLOX como controle e o plasmídeo AMPKAR para que pudesse ser feita uma comparação de eficiência entre o vetor original e o clonado. O resultado foi

positivo para as três amostras, com uma alta taxa de transfecção (>90%) nos casos do pbAMPKAR (Fig. 3A) e LLOX (Fig. 3D).



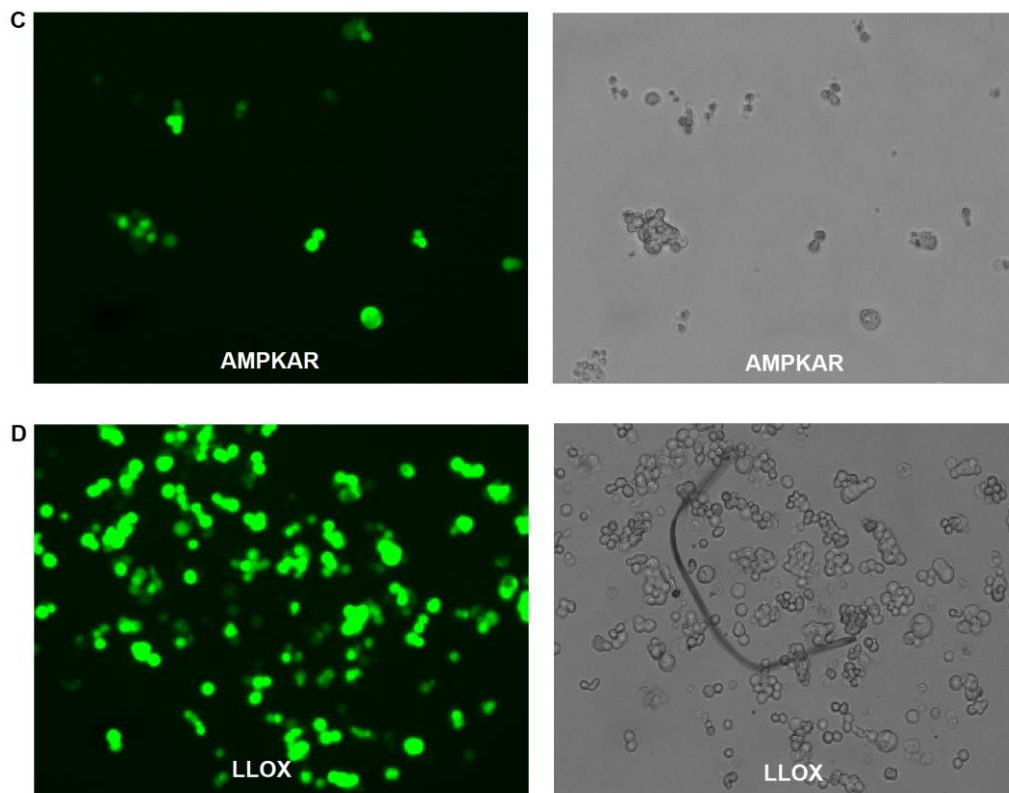


Figura 3. Transfecção teste do pbAMPKAR. Imagens capturadas dois dias após a realização da transfecção por Lipofectamina 3000 com o vetor pbAMPKAR em células da linhagem HEK no canal *Green BP* (esquerda, 515-565 nm) e no canal de luz visível (direita). **A**, captura de menor aumento (20x) das células transfectadas com o vetor pbAMPKAR. **B**, captura de maior aumento (40x) das células transfectadas com o vetor pbAMPKAR. **C**, captura das células transfectadas com o vetor original AMPKAR. **D**, captura das células transfectadas com o vetor LLOX.

3.5 Transposição do pbAMPKAR

Após a transfecção do vetor pbAMPKAR, foi feita a transposição utilizando o sistema piggyBac em células da linhagem A-172. O resultado também se mostrou bem sucedido (Fig. 4), apesar de a taxa de transposição ter sido baixa (< 10%) e a fluorescência ter se mostrado visualmente muito mais fraca do que a vista na transfecção (Fig. 3A), o que é esperado, visto que na transposição menos cópias do plasmídeo são normalmente incorporadas na célula.

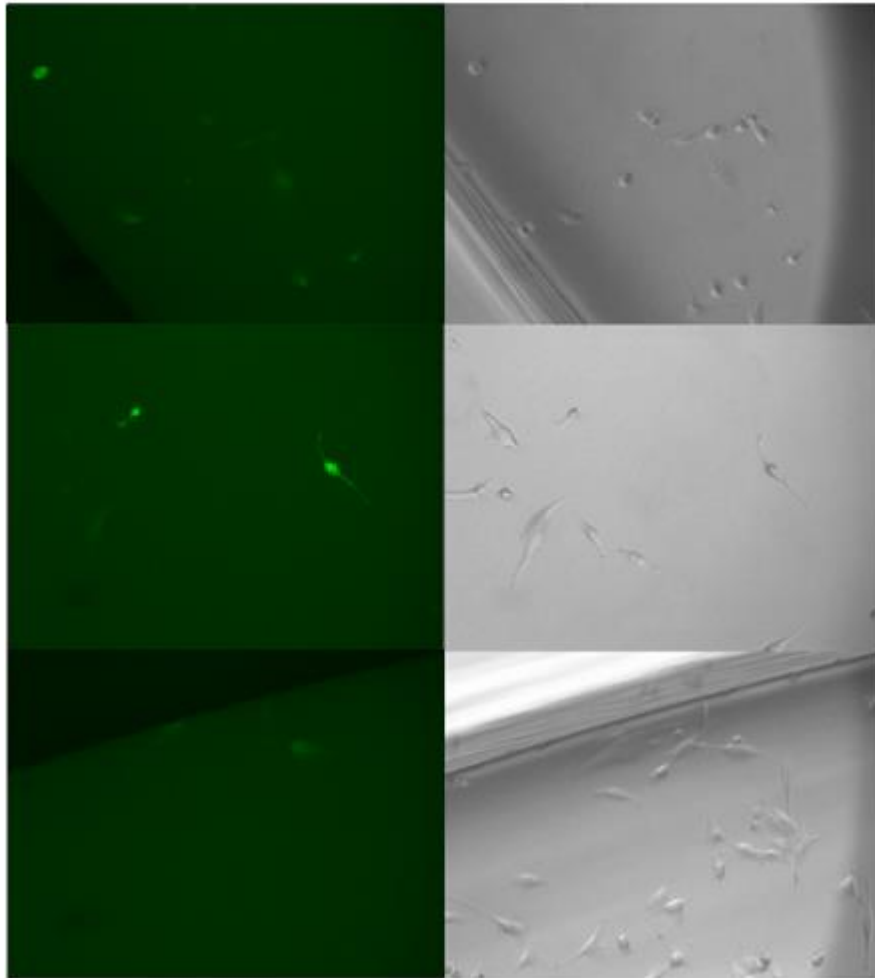


Figura 4. Linhagem A172 após a transposição do vetor pbAMPKAR. Imagens de campos do mesmo poço, capturadas dois dias após a transposição, no canal Green BP (esquerda, 515-565 nm) e no canal de luz visível (direita).

O fato de as células continuarem apresentando a expressão da proteína fluorescente mesmo após a passagem de 1 mês desde o dia da realização da transposição descarta a possibilidade de a incorporação ter sido passageira pela degradação completa do plasmídeo e evidencia a favor de uma possível incorporação cromossomal do vetor pbAMPKAR.

4 Discussão

A criação do vetor pbAMPKAR consistiu, a partir de clonagem molecular, na junção de duas partes de plasmídeos diferentes que, juntos, resultaram em um vetor que carrega tanto a sequência codificante da sonda-repórter AMPKAR quanto a sequência codificante para o

sistema piggyBac. Dessa forma, os resultados evidenciaram a possível incorporação cromossomal da sequência de interesse a partir do mecanismo da transposase, resultando na expressão estável e duradoura do biosensor. Para que a clonagem molecular por enzimas de restrição fosse possível, foi necessária a escolha de um par de enzimas que clivassem em sítios convenientes e no mesmo sentido em ambos os vetores: a BglII e EcoRI. Assim obteve-se, após a clivagem, duas sequências de DNA lineares que possuem extremidades coesivas capazes de se complementar, o que resultou na nova molécula de DNA contínua e circular.

O resultado da transfecção dos três plasmídeos com o vetor se apresentou satisfatório e pôde-se perceber também a alteração da morfologia das células nos três casos, onde as células aparecem em formato arredondado. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que o processo de transfecção pode causar um nível elevado de estresse devido à toxicidade do próprio reagente e da decorrente alta incorporação de proteínas, o que acaba dificultando também sua aderência ao fundo da placa e as deixa em suspensão ^[10]. A morfologia das células voltou ao normal após alguns dias.

Em relação ao processo de transposição, foi possível notar que a fluorescência apresentada na linhagem A-172 foi mais fraca quando comparada à fluorescência apresentada pós transfecção (mesmo após a normalização da morfologia das células HEK293T). Porém, é preciso levar em consideração que a linhagem utilizada na transfecção, a HEK293T (células de rim embrionárias humanas), possui uma taxa alta de incorporação e de crescimento, o que pode explicar o fato de a fluorescência ter se apresentado mais forte e em um maior número de células do que na linhagem tumoral em que foi feita a transposição ^[11]. Além disso, é preciso considerar que a fluorescência do vetor original AMPKAR por si só já se apresentou visualmente fraca no seu primeiro teste (Figura 1) na linhagem celular A172, sendo necessário fazer outros experimentos, como Western Blot, que possam demonstrar se a transfecção com o transposon foi capaz de interferir ou não no nível de produção de AMPK em relação ao controle. Junto a isso, torna-se necessário também medir a expressão basal de AMPK nas linhagens de glioblastoma, uma vez que essa informação não é encontrada na literatura, já que os artigos focados nessa quinase se relacionam muito mais com tecidos frequentemente associados ao metabolismo fisiológico, como os tecidos musculares esquelético e cardíaco.

Mais tarde também foi possível notar, nas células tumorais com expressão da proteína fluorescente, que estas passaram a ter uma velocidade de crescimento muito mais lenta quando

em comparação às células vizinhas que não tiveram incorporação do vetor, o que acabou dificultando a manutenção da cultura, uma vez que a parcela de células normais dominava a confluência do poço. A partir disso, também se torna-se necessário fazer uma nova transposição em uma linhagem celular tumoral diferente, para comparar o fenótipo de crescimento.

Em relação ao FRET, sua quantificação é uma metodologia bastante complexa e exige certas condições específicas para a realização de um cálculo correto. Aqui neste trabalho foi possível inferir o provável sucesso da construção do vetor e implementação na linhagem tumoral. Porém, é necessário considerar também alguns dos aspectos negativos e quais são as possíveis opções para aprimorar os resultados. Primeiramente, a obtenção dos dados das linhagens HEK e A-172 foi feita em microscópio óptico, no canal *Green BP*. Isso indicou a presença do vetor e, após a passagem de mais de 30 dias, a incorporação cromossomal e expressão estável da sonda. Porém, essas imagens não permitem a mensuração da eficiência da transferência de energia, uma vez que o comprimento de excitação desse canal encontra-se em 450-490nm e o seu filtro de emissão é entre 515-565nm^[7]. Os espectros de absorção das proteínas CFP e YFP são na faixa de aproximadamente 390nm-500nm e 420-550nm, respectivamente, e de emissão na faixa de aproximadamente 420nm-610nm e 490-600nm, respectivamente^[12]. Por elas terem um espectro de absorção que se sobrepõe nesse filtro, ambas são excitadas e podem emitir fluorescência, não sendo possível identificar o aumento de emissão da proteína aceptor e a diminuição de emissão da proteína doadora. Isso faz com que só seja possível inferir a incorporação do vetor.

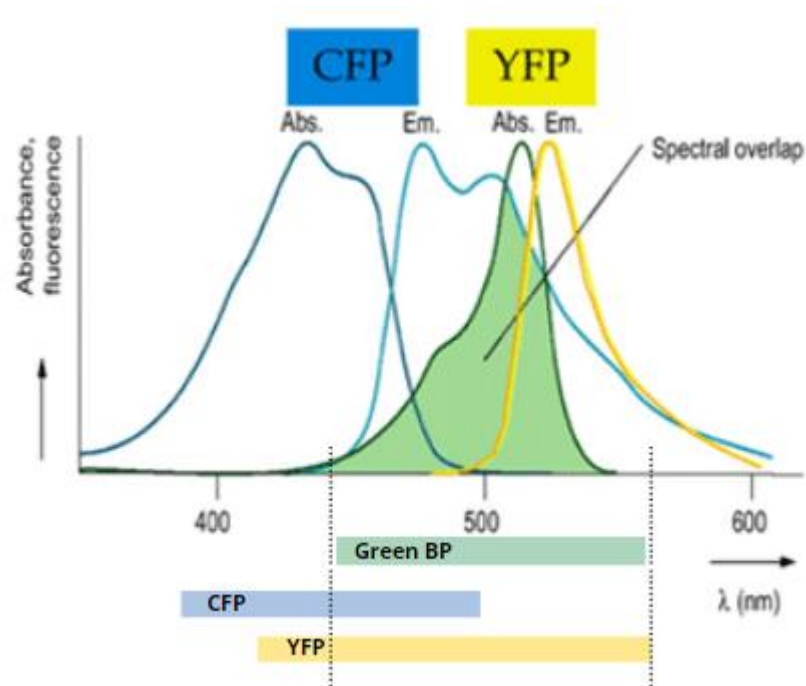


Figura 7. Excitação (*Abs.*) e emissão (*Em.*) do espectro de CFP e YFP. Fonte: WEIGEL, 2017.

Adaptado.

Por esse motivo, a quantificação por microscopia confocal é necessária, pois permite uma configuração em que os comprimentos de onda podem ser escolhidos de forma mais específica, permitindo a excitação em um comprimento de onda que abrace a faixa de excitação do CFP e o uso de canais que compreendem um filtro de emissão diferente para cada uma das proteínas, como foi feito na Figura 1, o que torna possível a cobertura e quantificação fidedigna da alteração entre as intensidades de emissão dos fluoróforos.

Outro ponto a ser discutido envolve o fato de que a quantificação feita a partir da Figura 1, obtida por microscopia confocal, não envolveu o tratamento prévio das imagens, o que torna o resultado mais impreciso. A presença de resíduos de polilisina, utilizada para a aderência das células na placa, interferiu no uso do *background* como fator a ser considerado no cálculo de correção, atrapalhando a quantificação precisa das imagens, que poderão apresentar ruídos que não deveriam ser incluídos no cálculo, mas acabam sendo devido à falta dessa correção. Portanto, também é necessário repetir esse experimento.

Em suma, a construção do vetor pbAMPKAR, e a sua implementação estável em linhagens tumorais, abre a possibilidade de análise da atividade e do papel da AMPK e sua dinâmica a longo prazo em células únicas. Ele pode ser usado para identificar se existe uma diferença basal

de expressão da AMPK entre células tumorais e células saudáveis, para avaliar qual a importância do papel da AMPK na sobrevivência tumoral, se a sua influência difere em diferentes tipos de tecidos tumorais, se o aumento da atividade da AMPK influencia ativamente nessa sobrevivência, seja em condições naturais ou em condições que incluem o uso de certos tratamentos, e junto da avaliação da provável dinâmica de fenótipo entre células que são clonais. Uma possível alternativa a ser utilizada, por exemplo, é o fármaco Metformina, primeira opção medicamentosa no tratamento de Diabetes tipo I, que funciona como um ativador da AMPK. Por ele já ser um medicamento bem estabilizado na indústria, de fácil acesso e que possui um retorno positivo quanto ao seu uso e efeitos adversos, vem sendo estudado, cada vez mais, a respeito da sua influência no metabolismo energético mitocondrial tumoral e, inclusive, como um possível inibidor de processos tumorigênicos ^[19, 20, 21]. Dessa forma, a união do uso de Metformina com uma sonda capaz de reportar a dinâmica intracelular da AMPK a longo prazo e o seu efeito em células vivas individuais, fornece um novo panorama de estudo para a contribuição da compreensão dos mecanismos de sobrevivência tumoral e de novos possíveis agentes e recursos terapêuticos que auxiliam no tratamento de câncer.

Referências

- [1] HANAHAN, D. A. and WEINBERG, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell Press. Lausanne, 144, 5, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- [2] FAUBERT, B. et al. 2013. AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth In Vivo. Cell Press. Montreal, 17, 1, 113-124. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.001>
- [3] J. DEBERARDINIS, R and CHANDEL, N. 2016. Fundamentals of cancer metabolism. Science Advances. Dallas, 2, 5, e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>.
- [4] LUO, Z. 2010. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. Future Oncol., Boston, 6, 3. <https://doi.org/10.2217/fon.09.174>

- [5] TSOU, P. et al. 2011. A Fluorescent Reporter of AMPK Activity and Cellular Energy Stress. *Cell Press. Boston*, 13, 4, 476-486. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.006>.
- [6] BECKENKAMP, R. et al. 2019. Characterization of soluble CD39 (SolCD39/ NTPDase1) from PiggyBac nonviral system as a tool to control the nucleotides level. *Portland Press. Porto Alegre*, 476, 11, 1637-1651. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190040>.
- [7] CARL ZEISS MICROSCOPY. Filter Set 10 Item Number 488010-9901-000. <https://www.micro-shop.zeiss.com/en/us/shop/filterAssistant/filtersets/488010-9901-000#/>. Acesso em: 31 ago. 2020.
- [8] SIMON A. et al. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism. Buffalo*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>.
- [9] ELDER, A. D. et al. 2008. A quantitative protocol for dynamic measurements of protein interactions by Förster resonance energy transfer-sensitized fluorescence emission. *J. R. Soc. Interface*. 6. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0381.focus>.
- [10] JUCKEM, Laura. Cellular Toxicity Caused by Transfection: Why is it important? <https://www.biocompare.com/Bench-Tips/121111-Cellular-Toxicity-Caused-by-Transfection-Why-is-it-important/>. 2012 (acessado em 19 agosto 2020).
- [11] Thomas, P., & Smart, T. G. 2005. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 51, 3, 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>.
- [12] WEIGEL, Christoph. Of Terms in Biology: FRET. <https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2017/11/of-terms-in-biology-fret.html>, 2017. Acesso em: 18 ago. 2020.

[13] FAUBERT B., et al. 2013. AMPK is a negative regulator of the Warburg Effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metabolism*. 8, 171, 113-124.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.001>.

[14] LUO, Z., ZANG, M. and GUO, W. 2010. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncology*. 6, 3, 457-470.

<https://doi.org/10.2217/fon.09.174>.

[16] CARLING, D. 2011. Amp-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nature Chemical Biology*. Londres, 7, 8, 512-518. <https://doi.org/10.1038/nchembio.610>.

[17] JEON, S. 2016 Regulation and function of AMPK in physiology and diseases.

Experimental & molecular medicine. Suwon, 48, 7. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.81>.

[18] HODGSON, L., SHEN, F. and HAHN, K. 2017. Biosensors for Characterizing the Dynamics of Rho Family GTPases in Living Cells. *Current Protocols in Cell Biology*. Bronx, 46, 14111-141126. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1411s46>.

[19] AMPK activators: Mechanisms of action and physiological activities. *Experimental and Molecular Medicine*, v. 48, n. 4, p. e224-12, 2016. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.16>

[20] SESEN, J. et al. Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. 1–24, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123721>

[21] VALTORTA, S. et al. Metformin and temozolomide, a synergic option to overcome resistance in glioblastoma multiforme models. *Oncotarget*, v. 8, n. 68, p. 113090–113104, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23028>.

[22] OLYMPUS. Confocal Laser Scanning Biological Microscope FV1000 FLUOVIEW. https://www.olympusamerica.com/files/seg_bio/fv1000_brochure.pdf. Acesso em: 18 dez. 2020.

Material suplementar

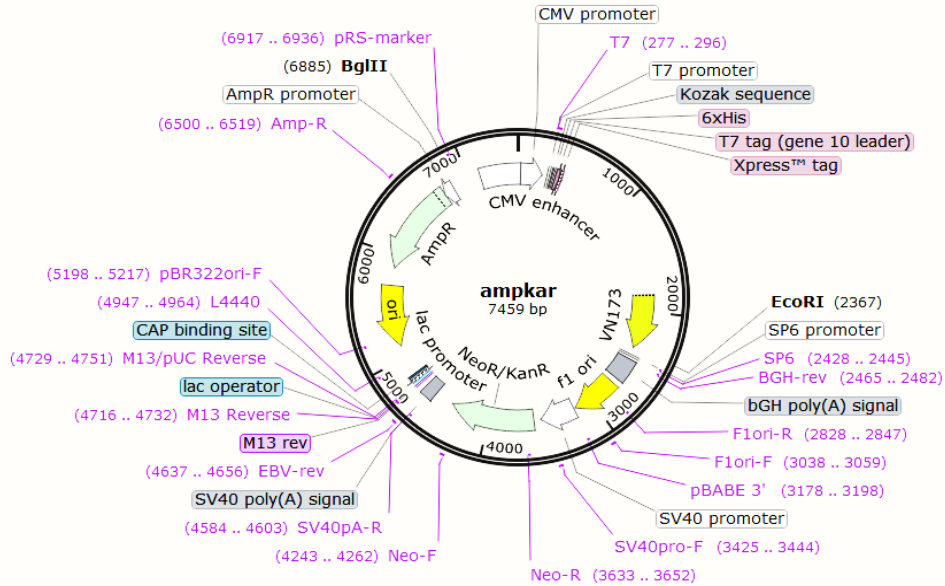


Figura S1. *Addgene Full Sequence Map for ampkar.* Mapa ilustrando os sítios de restrição necessários para a obtenção da sequência de interesse dentro do vetor pcDNA3 da AMPKAR. Disponível em: addgene.org/35097. Adaptado utilizando o software SnapGene.

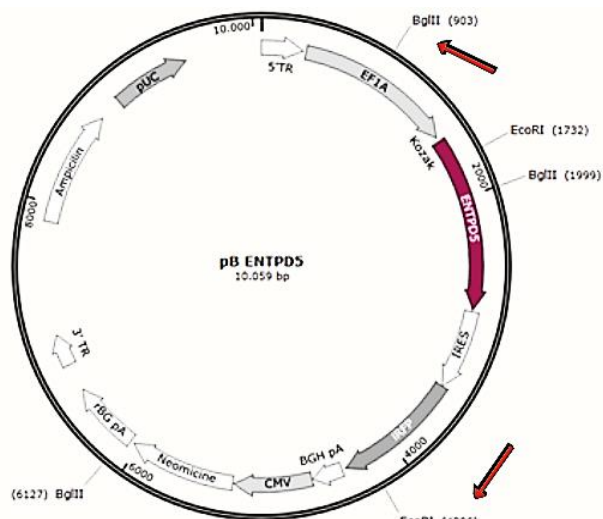


Figura S2. Mapa para a sequência do vetor transposon pB ENTDP5. Sinalização dos sítios de restrição necessários para a obtenção da sequência de interesse. Fonte: BECKENKAMP et al., 2019. Adaptado.

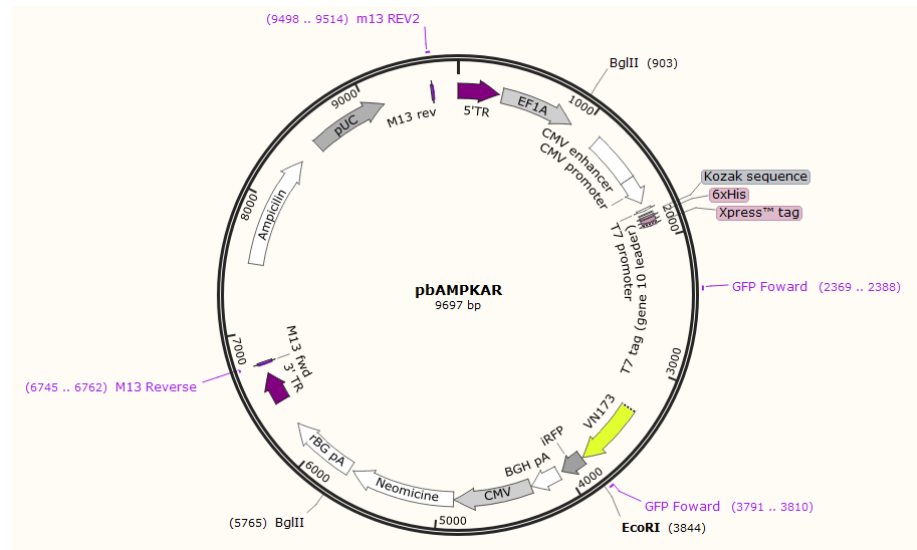


Figura S3. Mapa para sequência do vetor pbAMPKAR. Ilustração do mapa resultante da clonagem molecular proveniente dos vetores AMPKAR e pb ENTDP5. Fonte: autoria própria.

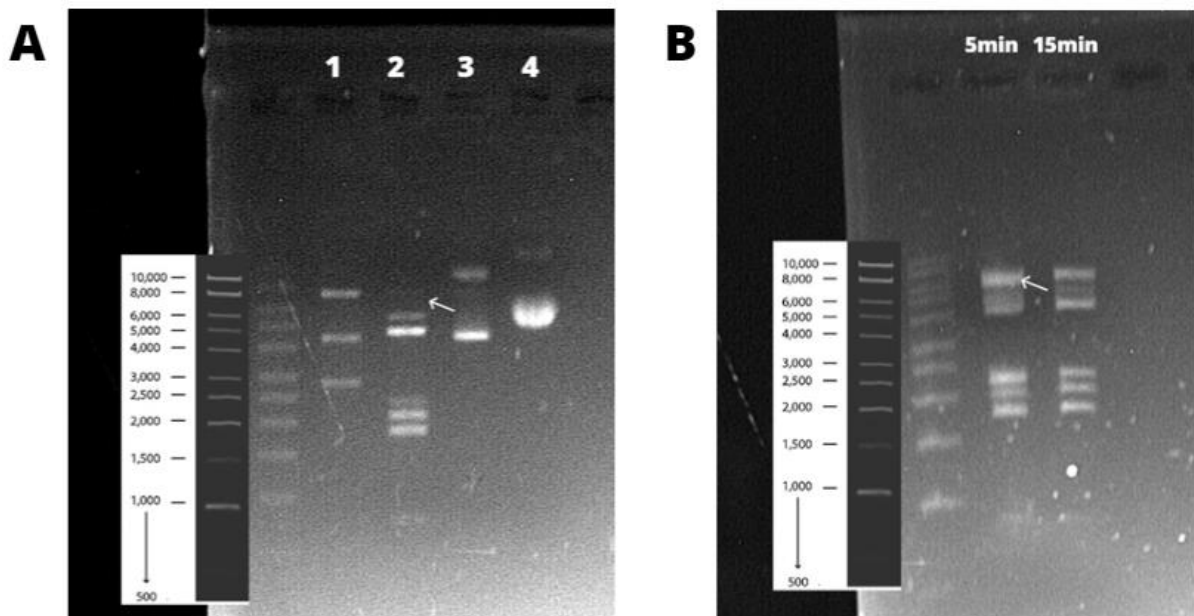


Figura S4. Digestão dos vetores AMPKAR e pBNTPD5. **A**, migração dos vetores digeridos. Colunas 1 e 2 correspondentes ao resultado da digestão dos vetores AMPKAR e pBNTPD5, respectivamente, e colunas 3 e 4 como controles, correspondentes à migração dos vetores íntegros AMPKAR e pBNTPD5, respectivamente. **B**, migração resultante da digestão parcial de BglII no vetor pBNTPD5 nos tempos 5 (esquerda) e 15 minutos (direita).

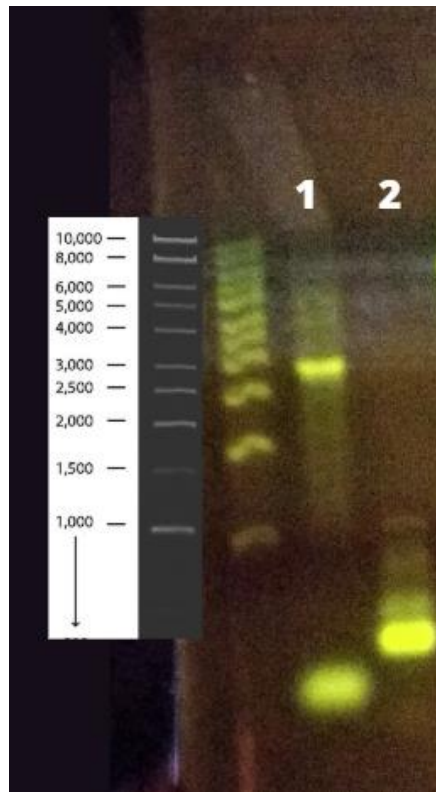


Figura S5. PCR de colônia. Resultado da amplificação do plasmídeo pbAMPKAR proveniente da colônia bacteriana selecionada em meio LB contendo ampicilina. Coluna 1 correspondente à amostra de colônia, utilizando o par de primers GFP Foward e M13 Reverse para o pbAMPKAR, e coluna 2 correspondente à amostra controle do plasmídeo LLOX utilizando o par de primers GFP Foward e GFP Reverse para o LLOX.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A execução desse trabalho permitiu demonstrar mais uma alternativa possível a ser desenvolvida e utilizada dentro do estudo da progressão tumoral e do efeito de agentes relacionados com a dinâmica de reprogramação metabólica energética que possam vir a ser utilizados no tratamento de câncer. Os resultados indicaram o sucesso dos resultados preliminares da construção desse novo vetor, tornando realidade a possibilidade do uso de uma estratégia inovadora e de alta relevância, uma vez que pode ser aplicada em células únicas e vivas, conta com a quantificação a partir da metodologia FRET, e permite sua análise ao longo do tempo.

Apesar disso, a sonda-repórter ainda precisa ser validada e sua quantificação precisa ser aprimorada. Por esse motivo, as perspectivas futuras desse trabalho incluem a seleção das células pbAMPKAR-positivas que possuem um gene de resistência a Neomicina e a validação da funcionalidade do vetor pelo uso de um fármaco ativador da AMPK, a Ionomicina, e sua quantificação em microscopia confocal antes e após o tratamento. Além disso, a partir da aquisição das imagens adquiridas pela microscopia confocal, será feita a correção e quantificação dessas imagens com o *script Biosensors Processing 2.1* (HODGSON; SHEN; HAHN, 2010), o qual já foi testado previamente em fotos cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Lamers (UFRGS). A partir da validação do vetor, os próximos objetivos também incluem avaliar a flutuação da atividade da AMPK em células da mesma colônia, de forma a comparar se existe diferença de comportamento entre células centrais e células periféricas, em colônias sem tratamento e em colônias que recebem tratamento com Metformina.

5 REFERÊNCIAS DO TEXTO PRINCIPAL

BEIS, I.; NEWSHOLME, E. A. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Journal**, v. 152, n. 1, p. 23–32, 1975.

BROUSSARD, J. A. et al. Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. **Nature Protocols**, v. 8, n. 2, p. 265–281, 2013.

CARLING, D. et al. AMP-activated protein kinase: Nature's energy sensor. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 512–518, 2011.

CARLO, D. DI; LEE, L. P. CELL ANALYSIS for Quantitative Biology. **Analytical Chemistry**, 2009.

CARRETERO, J. et al. Dysfunctional AMPK activity, signalling through mTOR and survival in response to energetic stress in LKB1-deficient lung cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 11, p. 1616–1625, 2007.

CONTRERAS, C. M. et al. Loss of Lkb1 provokes highly invasive endometrial adenocarcinomas. **Cancer Research**, v. 68, n. 3, p. 759–766, 2008.

DARIO R. ALESSI, KEI SAKAMOTO, J. R. B. LKB1-Dependent Signaling Pathways. **Nutrients and Cell Signaling**, p. 3–34, 2005.

FAUBERT, B. et al. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 165–170, 2015.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 11, n. 7, p. 1099–1113, 2015.

GEWIRTZ, D. A. The four faces of autophagy: Implications for cancer therapy. **Cancer Research**, v. 74, n. 3, p. 647–651, 2014.

GOWANS, G. J. et al. AMP is a true physiological regulator of amp-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 556–566, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. p. 1–14, 2011.

HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK : a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. April, 2012.

HODGSON, L.; SHEN, F.; HAHN, K. Biosensors for characterizing the dynamics of Rho family GTPases in living cells. **Current Protocols in Cell Biology**, n. SUPPLO. 46, p. 14111–141126, 2010.

JEON, S. M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. **Experimental & molecular medicine**, v. 48, n. 7, p. e245, 2016.

JONES, R. G.; THOMPSON, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism. **Genes and Development**, v. 23, n. 514, p. 537–548, 2009.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Third ed. Baltimore, Maryland, USA: Springer, 2006.

LIBERTI, M. V; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? (vol 41, pg 211, 2016). **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, SI, p. 287, 2016.

LUO, Z.; ZANG, M.; GUO, W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: Control of metabolism and cell growth. **Future Oncology**, v. 6, n. 3, p. 457–470, 2010.

MIHAYLOVA, M. M.; SHAW, R. J. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. **Nature cell biology**, v. 13, n. 9, p. 1016–1023, 2011.

MICROSCOPY: Forster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. Vídeo aula ministrada por Philippe Bastiaens. Si: Ibiology, 2012. (36 min.), son., color. Disponível em: <https://www.ibiology.org/talks/forster-resonance-energy-transfer/>. Acesso em: 17 agosto 2020

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. [s.l: s.n.].

NEW ENGLAND BIOLABS INC. A Beginner's Guide to Lentiviral Transduction. 2017. Disponível em: <<https://bitesizebio.com/41748/a-beginners-guide-to-lentiviral-transduction/>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

NEW ENGLAND BIOLABS INC. Comparing Viral Vector Expression Systems. 2017. Disponível em: <<https://bitesizebio.com/25147/comparing-viral-vector-expression-systems/>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

NIKON. Basics of FRET Microscopy: Fundamental Principles of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy with Fluorescent Proteins <Disponível em <https://www.microscopyu.com/applications/fret/basics-of-fret-microscopy>>. Acesso em: 9 nov. 2019.

PAEK, A. L. et al. Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 631–642, 2016.

PAVLIDES, S. et al. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. **Cell Cycle**, v. 8, n. 23, p. 3984–4001, 2009.

PEARSON, H. B. et al. Lkb1 deficiency causes prostate neoplasia in the mouse. **Cancer Research**, v. 68, n. 7, p. 2223–2232, 2008.

REYES, J.; LAHAV, G. Leveraging and coping with uncertainty in the response of individual cells to therapy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 51, p. 109–115, 2018.

ROSENFELDT, M. T.; RYAN, K. M. The multiple roles of autophagy in cancer. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 7, p. 955–963, 2011.

SAHA, S. et al. Evaluating the potential for undesired genomic effects of the piggyBac transposon system in human cells. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 3, p. 1770–1782, 2015.

SCIENCE DIRECT. Lentivirus Vector. 2019. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/lentivirus-vector>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

STROHHÖFER, C. et al. Quantitative analysis of energy transfer between fluorescent proteins in CFP-GBP-YFP and its response to Ca²⁺. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 39, p. 17852–17863, 2011.

SYSTEM BIOSCIENCES (SBI). PiggyBac™ Transposon Vector System Cat - #PBxxx-1 - User Manual. Disponível em: <https://www.systembio.com/wp-content/uploads/Manual_PiggyBac_Web.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2020.

TSOU, P. et al. Resource A Fluorescent Reporter of AMPK Activity and Cellular Energy Stress. 2011.

WARBURG, O., WIND, F., & NEGELEIN, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. **he Journal of general physiology**, v. 8, n. 6, p. 519–530, 1927.

WEIGEL, Christoph. Of Terms in Biology: FRET. 2017. Disponível em: <https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2017/11/of-terms-in-biology-fret.html>. Acesso em: 18 ago. 2020.

WILDE, L. et al. Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. **Seminars in Oncology**, v. 44, n. 3, p. 198–203, 2017.

WILSON, M. H.; WOODARD, L. E. piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1304–1314, 2015.

XIANG, X. et al. AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 321, n. 1, p. 161–167, 2004.

YUN, C. W.; LEE, S. H. The roles of autophagy in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–18, 2018.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ELSEVIER METHODS

ARTICLE STRUCTURE

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix,

Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated

as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: <https://www.elsevier.com/authors/journal-authors/highlights>. Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). Only required for full research articles.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These Keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Names of chemical or organic substances should follow the recommendations of the IUPAC-IUBMB Joint Combined Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Authors should draw attention to any particular hazards that may be involved in carrying out the methods described. Any relevant safety precautions should be described; if an accepted code of practice has been followed, a reference to the relevant standards should be given. Because the value of a method is entirely dependent on the availability of all materials, sources for critical reagents and instruments must be clearly identified. In reports of experiments involving recombinant DNA molecules, constructed in vitro and subsequently inserted into cells, reference must be made to the appropriate NIH guidelines and/or other pertinent regulations or, if comparable documents exist in the country where the work was done, these may be referenced. Significant deviations from the recommended practices should be described. In those circumstances where the host system has been certified as disabled by the NIH Program Advisory Committee on Recombinant DNA, that certification should be noted.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly.

For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in

accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.