

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

Paola Farias Lorenzatto

**VALIDAÇÃO DE BIOSSENSOR FLUORESCENTE DA RAZÃO INTRACELULAR
ATP:ADP EM CÉLULAS VIVAS**

Porto Alegre

2024

Paola Farias Lorenzatto

**VALIDAÇÃO DE BIOCSENSOR FLUORESCENTE DA RAZÃO INTRACELULAR
ATP:ADP EM CÉLULAS VIVAS**

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: Dra. Danieli Rosane Dallemole

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Lorenzatto, Paola
Validação de biossensor fluorescente da razão
intracelular ATP:ADP em células vivas / Paola
Lorenzatto. -- 2024.
61 f.
Orientador: Guido Lenz.

Coorientadora: Danieli Dallemole.

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, 2024.

1. Perceval. 2. ATP. 3. Reprogramação metabólica.
4. Câncer. 5. Single cell . I. Lenz, Guido, orient.
II. Dallemole, Danieli, coorient. III. Título.

Paola Farias Lorenzatto

**VALIDAÇÃO DE BIOSSENSOR FLUORESCENTE DA RAZÃO INTRACELULAR
ATP:ADP EM CÉLULAS VIVAS**

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: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Klamt - UFRGS

Dra. Luana Lenz - UFRGS

Dra. Danieli Dallemole - UFRGS (coorientadora)

Prof. Dr. Guido Lenz - UFRGS (orientador)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Ivamar**, que desde antes da faculdade me fez enxergar o quanto era importante fazer dos estudos a minha prioridade, que sempre se preocupou com cada detalhe e vibrou comigo por cada conquista. Obrigada por ser minha melhor amiga. Por ter entendido o estresse, a minha ausência e por ter me dado força todas as vezes que eu precisei.

Ao meu pai, **Sidomar**, que sempre me incentivou, investiu nos meus estudos e em tudo o que considerou ser o melhor para mim. Que, apesar de ter enfrentado um problema de saúde extremamente delicado ao longo da minha graduação, sempre me fez olhar a vida com mais otimismo e esperança.

À minha dinda, **Angeli**, que hoje não está mais entre nós, mas foi essencial desde antes da graduação, quando me cuidou por tantos anos como uma segunda mãe. Obrigada por ter me ensinado tanto sobre a vida e por todas as conversas, risadas e abraços. Eu sempre vou carregar o teu amor e a tua alegria no meu coração.

Ao meu namorado, **Matheus**, que segurou a minha mão, escutou as minhas angústias e inseguranças e que sempre acreditou em mim e me incentivou. Obrigada por ter me ajudado tanto de tantas formas e por ter estado do meu lado e me amado nos momentos mais difíceis.

Às amigas que a graduação me proporcionou, **Victória, Aline e Juliana**. Obrigada por terem sido as pessoas com quem eu compartilhei muito mais do que todas as fases da graduação. Compartilhamos experiências de vida e momentos de risadas, que, com certeza, tornaram esses anos mais fáceis. Sempre vou torcer pela felicidade de cada uma de vocês.

À minha coorientadora, **Danieli**, que é uma pessoa maravilhosa e me ensinou muito sobre não desistir. Que me ensinou a olhar as coisas com um olhar mais crítico e, ao mesmo tempo, otimista. Que dividiu comigo os momentos de conquistas e, também, de frustração. Obrigada por ter sido, em muitos momentos, além de coorientadora, uma amiga.

Ao meu orientador, **Guido**, que me orientou, como aluna de iniciação científica, durante três anos da minha graduação. Obrigada pela oportunidade de aprender com o teu conhecimento e experiência, com as tuas ideias e com o teu entusiasmo pela ciência.

A todos os professores que tive ao longo da graduação e aos alunos e pesquisadores do LabSinal, em especial à **Eloísa**, obrigada por terem compartilhado tanto conhecimento comigo. Vocês são brilhantes e foi um privilégio aprender com cada um de vocês.

Ter pessoas como vocês ao meu lado me deu força e discernimento para chegar até aqui e, por isso, eu vou ser eternamente grata.

Obrigada.

RESUMO

O *status* energético do metabolismo celular é responsável por regular a atividade de diversas enzimas envolvidas em diferentes processos celulares, como a divisão celular. A hidrólise da molécula de adenosina 5'-trifosfato (ATP) é a principal fonte de energia pelas células, sendo que sua concentração fisiológica impacta diretamente na atividade metabólica e no comportamento celular. Em condições fisiológicas, o processo de obtenção de ATP se inicia pela via glicolítica, que é responsável por oxidar a molécula de glicose e, posteriormente, enviar seus metabólitos para a cadeia transportadora de elétrons - a principal via de obtenção de moléculas de ATP. No entanto, em células proliferativas e em células tumorais, a glicólise se torna a principal fonte de obtenção de ATP - uma reprogramação metabólica, denominada efeito Warburg, já bem descrita em tumores. Neste contexto, este trabalho foi proposto como uma forma de validar o uso de um biossensor fluorescente repórter da razão intracelular ATP:ADP, o GW1CMV-Perceval, e verificar sua funcionalidade em células de linhagens celulares de glioblastoma humano por meio da expressão transiente do vetor e de diferentes métodos de análises de fluorescência. Os dados preliminares apresentados demonstram a funcionalidade do sensor em diferentes linhagens celulares (normal e tumoral) e sugerem a capacidade do plasmídeo em medir alterações na razão intracelular ATP:ADP induzidas por tratamentos com inibidores da via glicolítica e da fosforilação oxidativa a nível populacional e de células únicas - sendo uma potencial ferramenta para contribuir no estudo do metabolismo de células tumorais e do seu impacto na resistência aos tratamentos usuais.

Palavras-chave: ATP; Perceval; reprogramação metabólica; câncer.

ABSTRACT

The energetic status of cellular metabolism is responsible for regulating the activity of several enzymes involved in different cellular processes, such as cell division. The hydrolysis of the adenosine 5'-triphosphate (ATP) molecule is the main source of energy for cells, and its physiological concentration directly impacts metabolic activity and cellular behavior. Under physiological conditions, the process of obtaining ATP begins through the glycolytic pathway, which is responsible for oxidizing the glucose molecule and, subsequently, sending its metabolites to the electron transport chain - the main route for obtaining ATP molecules. However, in proliferative cells and tumor cells, glycolysis becomes the main source of obtaining ATP - a metabolic reprogramming, called the Warburg effect, already well described in tumors. In this context, this study was proposed to validate the use of a fluorescent biosensor reporter of the intracellular ATP:ADP ratio, the GW1CMV-Perceval, and verify its functionality in cells from human glioblastoma cell lines through transient expression of the vector and different fluorescence analysis methods. The preliminary data presented demonstrate the functionality of the sensor in different cell lines (normal and tumor) and suggest the ability of the plasmid to report changes in the intracellular ATP:ADP ratio induced by treatments with inhibitors of the glycolytic pathway and oxidative phosphorylation at a population level and in single cells - being a potential tool to contribute to the study of tumor cell metabolism and its impact on resistance to usual treatments.

Keywords: ATP; Perceval; metabolic reprogramming; cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A desregulação do metabolismo energético como uma <i>hallmark</i> do câncer.....	12
Figura 2 – O constructo utilizado no biossensor Perceval.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de biossensores fluorescentes do metabolismo celular.....	17
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	ATP E A REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA EM TUMORES.....	12
1.2	ATP E O SISTEMA PURINÉRGICO.....	16
1.3	O USO DE BIOSSENSORES FLUORESCENTES NO ESTUDO DO METABOLISMO EM CÉLULAS VIVAS.....	17
1.3.1	As análises a nível de célula única.....	18
1.4	PERCEVAL.....	19
1.5	JUSTIFICATIVA.....	21
1.6	OBJETIVOS.....	21
1.6.1	Objetivo geral.....	21
1.6.2	Objetivos específicos.....	21
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA EXPERIMENTAL CELL RESEARCH.....	54

1 INTRODUÇÃO

Uma em cada cinco pessoas irá desenvolver câncer ao longo da vida, conforme dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC - do inglês *International Agency for Research on Cancer*). Além disso, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda causa de morte no mundo, apresentando uma das maiores taxas de incidência entre a população mundial (World Health Organization, 2023). Por isso, hoje, um dos principais focos de estudo da pesquisa básica é a busca por novas ferramentas que possibilitem entender os mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento do câncer e à resistência ao tratamento, auxiliando, assim, no desenvolvimento de terapias mais eficazes.

O termo câncer engloba diversos tipos e subtipos de doenças que se caracterizam, principalmente, por apresentarem células com proliferação anormal e resistentes aos sinais de morte celular, formando uma massa tumoral (National Cancer Institute, 2023). Contudo, décadas de pesquisa científica demonstraram que o câncer é uma doença de alta complexidade, apresentando características, que são descritas como *hallmarks* do câncer, que impactam tanto na sua formação como na sobrevivência das células tumorais em resposta a uma terapia (Hanahan; Weinberg, 2000). Nesse contexto, em 2011, a reprogramação do metabolismo energético foi incluída como uma das características que permitem o crescimento, a proliferação e a sobrevivência de células tumorais, como ilustrado na Figura 1 (Hanahan; Weinberg, 2011). Ao contrário de células saudáveis, que, em condições favoráveis de oxigênio, metabolizam a glicose por meio da via glicolítica e, posteriormente, pela fosforilação oxidativa - que é a forma mais eficiente de obtenção de energia - as células tumorais, mesmo em condições aeróbicas, conseguem reprogramar seu metabolismo e favorecer a via glicolítica em detrimento da fosforilação oxidativa. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez por Otto Warburg e que, por isso, ficou conhecido como Efeito Warburg (Warburg *et al.*, 1927). Sabendo da contribuição da reprogramação metabólica no processo de tumorigênese e na sobrevivência das células tumorais, o desenvolvimento e a validação de novas ferramentas para avaliar o metabolismo energético de tumores são relevantes para esclarecer questões ainda não solucionadas acerca do metabolismo e da sua contribuição na sobrevivência das células tumorais após o tratamento.

Figura 1. A desregulação do metabolismo energético como uma *hallmark* do câncer.

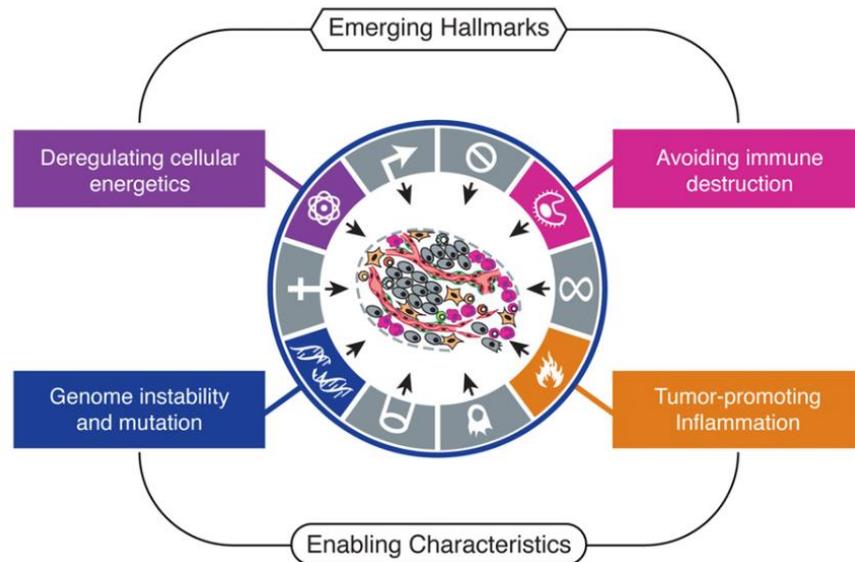


Ilustração indicando a inclusão da reprogramação do metabolismo energético como uma *hallmark* do câncer.

Fonte: Hanahan and Weinberg, 2011.

1.1 ATP E A REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA EM TUMORES

A molécula de adenosina 5'-trifosfato (ATP) é um nucleotídeo constituído por uma ribose ligada a uma adenina e a três grupamentos fosfatos, sendo que a ligação entre os fosfatos se caracteriza por ser altamente energética e, por isso, o ATP é considerado a “moeda energética” do organismo, visto que carrega e armazena muita energia nas suas ligações. Durante o processo de hidrólise do ATP, que ocorre quando há interação com a água, há liberação de fosfato inorgânico e de adenosina difosfato (ADP). O rompimento da ligação entre um grupamento fosfato e a molécula de ATP leva a liberação de energia livre, que é essencial para diversas reações enzimáticas envolvidas em diferentes processos celulares, como a síntese de macromoléculas e a proliferação celular (Nelson; Cox, 2014, seq. 8.4).

Em células eucarióticas, as reações que culminam em moléculas de ATP se iniciam quando a glicose – que é a principal fonte de ATP –, proveniente da dieta e disponível na circulação sanguínea, é internalizada pelas células. Em situações fisiológicas, a molécula de glicose, quando no meio intracelular, é fosforilada pela enzima hexocinase a glicose-6-fosfato, que, ainda no citoplasma, é direcionada para a via glicolítica - ou glicólise. A glicólise é um processo anaeróbico e é a primeira via metabólica de oxidação da glicose, que ao final, culmina na oxidação de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato. Ao longo do processo, as reações das enzimas envolvidas na via glicolítica resultam em um rendimento total, ao final, de duas moléculas de ATP, conforme a equação global: $\text{glicose} + 2 \text{NAD}^+ + 2 \text{ADP} + 2 \text{Pi} \rightarrow$

2 piruvatos + 2 NADH⁺ + 2H⁺ + 2 ATP + 2 H₂O (Nelson; Cox, 2014, seq. 14.1). O piruvato, em condições aeróbicas, é convertido, principalmente, em acetil-CoA e, na matriz mitocondrial, segue no processo de oxidação através do ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs, que por sua vez disponibiliza metabólitos intermediários para diversas reações de síntese no meio intracelular. Ao longo da glicólise e do ciclo de Krebs, que são vias que visam oxidar a molécula de glicose, ocorrem diversas reações de oxirredução, sendo que os elétrons dessas reações são doados para moléculas aceptoras universais de elétrons, como os nucleotídeos de nicotinamida (NAD⁺) e os nucleotídeos de flavina (FAD), que, por sua vez, direcionam os elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, na membrana mitocondrial interna. A cadeia transportadora de elétrons ou fosforilação oxidativa é constituída por quatro complexos de enzimas que compõem a respiração mitocondrial, que é responsável pela maior parte de obtenção de moléculas de ATP a partir da glicose e que utiliza o oxigênio como acceptor final de elétrons e, por isso, necessita de condições favoráveis de oxigênio para ocorrer (Nelson; Cox, 2014, seq. 19.1; Flood *et al.*, 2023). É importante ressaltar que, além da molécula de glicose, outros substratos podem alimentar as reações da glicólise e do ciclo de Krebs, como a molécula de acetil-CoA, que pode vir da oxidação de ácidos graxos e de aminoácidos – contribuindo, também, para a produção de moléculas de ATP (Bonora *et al.*, 2012).

Em condições fisiológicas, a concentração intracelular de ATP (1 a 10 mM) é maior em relação às concentrações de ADP (1 mM) e AMP (<0,1 mM) (Nelson; Cox, 2014, seq. 15.1; Kennedy *et al.*, 1999; Greiner; Glonek, 2021); e em condições adversas, como na hipóxia, a concentração intracelular de ATP pode diminuir em até 30% (Heerlein *et al.*, 2005). No entanto, é importante ressaltar que as células estão constantemente adaptando seu metabolismo conforme a disponibilidade de nutrientes (Herzig; Shaw, 2018). Quando as células utilizam seus recursos de energia armazenada para manter as vias metabólicas que promovem a homeostase, há hidrólise de ATP a ADP, que posteriormente é hidrolisado a AMP (adenosina monofosfato) e, conseqüentemente, há uma diminuição na concentração intracelular de ATP. Neste contexto, a enzima adenilato quinase participa da regulação dos nucleotídeos de adenina, visto que a sua função é produzir AMP a partir do ADP gerado da hidrólise do ATP, conforme a reação: 2 ADP → AMP + ATP (Dzeja; Terzic, 2009). Do mesmo modo, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) desempenha um papel chave na regulação do metabolismo, visto que é ativada por mudanças nas razões ATP:ADP e ATP:AMP (principalmente, pelo aumento na concentração intracelular de AMP) e frente a uma diminuição nessas razões, é responsável por fosforilar e inibir a ação de enzimas de processos anabólicos, como a lipogênese, e de ativar enzimas envolvidas em vias catabólicas, como a glicólise e a fosforilação oxidativa. A inibição e a

ativação de enzimas pela AMPK são realizadas, portanto, para regular as concentrações fisiológicas de ATP, permitindo que as reações metabólicas continuem ocorrendo (Ning *et al.*, 2013; Marsin *et al.*, 2000). Em condições que levam à hipóxia, na qual a concentração de ATP diminui, a adenilato quinase é responsável por repor parte do ATP intracelular e, ao mesmo tempo, sinalizar para a AMPK o déficit de ATP através da produção de AMP. Por isso, essas duas enzimas exercem um papel fundamental na regulação da concentração intracelular dos nucleotídeos de adenina e, conseqüentemente, na homeostase celular.

Como supracitado, em condições aeróbicas, o piruvato obtido ao final da via glicolítica é direcionado para o ciclo de Krebs e, posteriormente, para a fosforilação oxidativa, visto que esta é a forma mais eficiente de obter energia a partir da glicose. Por outro lado, em condições anaeróbicas - nas quais não há oxigênio suficiente disponível para ocorrer a fosforilação oxidativa -, o piruvato é direcionado para a fermentação láctica, que resulta em uma menor quantidade de moléculas de ATP a partir da glicose, mas recicla o NADH em NAD⁺, permitindo que as reações de oxirredução continuem ocorrendo (Nelson; Cox, 2014, seq. 14.3). Entretanto, na década de 1920, Otto Warburg observou que células tumorais, mesmo em condições favoráveis de oxigênio, direcionam o piruvato obtido na glicólise para a fermentação láctica e favorecem a via glicolítica ao invés da fosforilação oxidativa para obter energia a partir da glicose - o efeito Warburg. O efeito Warburg descreve que células tumorais captam maiores quantidades de glicose em comparação às células saudáveis, através da superexpressão de proteínas transportadoras de glicose - como a GLUT1 -, e que, células tumorais, preferem a via glicolítica para obter energia ao invés da fosforilação oxidativa (DeBerardinis *et al.*, 2008). Além disso, estudos posteriores a observação do efeito Warburg demonstraram que células tumorais secretam maiores quantidades de lactato em comparação a células saudáveis, sugerindo que grande parte do piruvato obtido ao final da glicólise, mesmo em condições favoráveis de oxigênio, seja direcionado para a fermentação láctica (Vander Heiden *et al.*, 2009). Apesar da respiração mitocondrial ser a principal via de obtenção de energia a partir da glicose nas células, quando o fluxo de glicose pela via glicolítica é alto, a glicólise consegue aumentar o fornecimento de moléculas de ATP (DeBerardinis *et al.*, 2008). Ademais, a glicólise consegue fornecer metabólitos importantes para a biossíntese de macromoléculas necessárias para a divisão celular - quando as células precisam duplicar seus componentes para dar origem a duas células filhas. Ou seja, o favorecimento da glicólise em detrimento da fosforilação oxidativa, em células tumorais, pode ser vantajoso para suportar a proliferação celular descontrolada e, ao mesmo tempo, manter os níveis de ATP (Liberti; Locasale, 2016).

Existem evidências da reversão de fenótipo respiratório para o glicolítico associada à atividade de ectonucleotidases fundamentais para a tradução e dobramento proteico, a fim de prevenir a exaustão metabólica da célula. Tal reversão ocorre, pois, a produção de proteínas funcionais é um processo que requer alto gasto energético e, por isso, depende da biodisponibilidade de aminoácidos e ATP. Como exemplo, a preferência pela via glicolítica em detrimento da fosforilação oxidativa observada em células tumorais é relacionada, em parte, à superexpressão de ectonucleotidases como a NTPDase5, que é codificada pelo gene ENTPD5 e pode ser encontrada na forma secretada, na qual atua no meio extracelular como componente do sistema purinérgico (Mulero *et al.*, 2005), ou aderida ao retículo endoplasmático (RE), sendo responsável pela hidrólise de UDP para promover a N-glicosilação e enovelamento de proteínas (Fang *et al.*, 2010). O processo de N-glicosilação, que é essencial para sinalizar o estado de enovelamento das proteínas, necessita da hidrólise da molécula de UDP-glicose e envolve a adição da molécula de glicose - proveniente da molécula UDP-glicose - na estrutura da proteína. Quando há hidrólise da UDP-glicose, os níveis de UDP aumentam no RE e a NTPDase5 atua hidrolisando este nucleotídeo a AMP/UMP, para que esse seja enviado para o citoplasma e possa ser transformado, novamente, em UDP-glicose - reação que necessita da hidrólise de ATP no citoplasma (De Campos *et al.*, 2021). Portanto, um aumento na atividade da NTPDase5 no RE aumenta o consumo de ATP, diminuindo sua concentração no meio intracelular (Recio *et al.*, 2002). Em células tumorais, observou-se que a deficiência da proteína PTEN está relacionada com a superexpressão do gene ENTPD5. Dessa forma, o aumento da atividade da NTPDase5 leva ao aumento nos níveis de UDP no RE e a diminuição de ATP no citoplasma. A diminuição dos níveis de ATP no citoplasma ativa diferentes enzimas envolvidas em processos metabólicos, como a PFK, uma enzima da via glicolítica. Por isso, em células tumorais, a superexpressão de NTPDase5 foi associada com o aumento da atividade da via glicolítica (Fang *et al.*, 2010), o que caracteriza, em parte, o efeito Warburg. O aumento da atividade da NTPDase5 é favorável, visto que proteínas envolvidas na proliferação celular, como receptores de fatores de crescimento, passam pelo processo de enovelamento no RE - o que sugere uma conexão entre o aumento de atividade da NTPDase5, um maior consumo de ATP citoplasmático e a preferência da via glicolítica para favorecer o crescimento celular (Fang *et al.*, 2010). Por conta do seu papel já descrito na reprogramação metabólica de células tumorais, células transformadas com *knockdown* ou *knockin* para o gene ENTPD5 podem servir como um bom modelo para avaliar o estado metabólico celular, bem como podem ser objeto de estudo para a investigação do estado metabólico utilizando um biossensor fluorescente desenvolvido para esta finalidade.

1.2 ATP E O SISTEMA PURINÉRGICO

Além de prover a energia necessária para diversas reações do metabolismo no meio intracelular, a molécula de ATP desempenha, também, um papel importante no meio extracelular, sendo uma molécula constituinte do sistema purinérgico (Qian *et al.*, 2014). O sistema purinérgico é constituído por nucleotídeos - como o ATP - nucleosídeos, receptores e enzimas responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular, as chamadas ectonucleotidases (Huang *et al.*, 2021). Em condições fisiológicas, a molécula de ATP é liberada para o meio extracelular durante o processo de necrose, por exemplo, que pode ocorrer quando um tecido sofre uma lesão. No meio extracelular, o ATP atua como uma molécula pró-inflamatória, exercendo um papel quimiotático nas células do sistema imune a fim de atrair as mesmas para a região lesionada. Na medida em que ocorre a resposta inflamatória, as ectonucleotidases hidrolisam o ATP em adenosina, uma molécula anti-inflamatória que ajuda a frear a ação das células do sistema imunológico (Cekic; Linden, 2016). Por isso, a molécula de ATP desempenha uma função essencial durante o reparo de tecidos lesionados e, também, na modulação do sistema imunológico.

No contexto patológico do câncer, estudos demonstraram que os níveis de ATP extracelular no microambiente tumoral são significativamente maiores em comparação a tecidos saudáveis (Qian *et al.*, 2014). Além disso, células tumorais apresentam altos níveis de expressão de ectonucleotidases, como a CD73, que, no meio extracelular, cataboliza o AMP em adenosina, uma molécula anti-inflamatória que promove evasão do sistema imune pelas células tumorais (Stagg; Smyth, 2010). Nos glioblastomas, por exemplo, dados recentes de sequenciamento de RNA demonstraram que há uma correlação espacial entre células tumorais que expressam altos níveis de CD73 e células do sistema imune que apresentam altos níveis de CD39, uma ectonucleotidase responsável por hidrolisar ATP, promovendo um ambiente anti-inflamatório rico em adenosina (Coy *et al.*, 2022). Além disso, pesquisadores observaram que quando células de câncer de pulmão são tratadas com o quimioterápico sunitinibe - que atua competindo com o ATP pelo sítio de enzimas tirosina cinases - há um aumento na captação de ATP extracelular pelas células tumorais induzido pelo tratamento que provoca o aumento do ATP intracelular e promove a resistência à quimioterapia (Qian *et al.*, 2014). Os exemplos citados ressaltam o impacto das alterações nas concentrações intracelular e extracelular de ATP na sobrevivência das células tumorais e na resistência ao tratamento. Por isso, frente aos diferentes papéis do ATP tanto no metabolismo extracelular e intracelular (Morrone *et al.*, 2003; Jacques-Silva *et al.*, 2005; Jacques-Silva *et al.*, 2009), faz-se relevante o estudo de novas

ferramentas que permitam avaliar de forma mais fidedigna as funções do ATP e do metabolismo energético nas células, incluindo células tumorais.

1.3 O USO DE BIOSSENSORES FLUORESCENTES NO ESTUDO DO METABOLISMO EM CÉLULAS VIVAS

Os métodos mais utilizados, atualmente, para avaliar o metabolismo das células, como ensaios quimioluminescentes – que utilizam o sistema luciferina/luciferase - e a respirometria de alta resolução, necessitam de lise celular e/ou permitem apenas análises populacionais. Estas análises pontuais e/ou análises populacionais, muitas vezes, refletem a média do *status* energético das células, não indicando a presença de células com comportamentos extremos - denominadas *outliers*. (White; Yang, 2022). Em contrapartida, os biossensores geneticamente codificados surgiram como uma forma de acompanhar o metabolismo energético de células vivas ao longo do tempo e de avaliar, a nível de célula única, a dinâmica do metabolismo em resposta a diferentes estímulos. Os biossensores fluorescentes, como os exemplificados na Tabela 1, apresentam grande eficiência em avaliar o estado metabólico celular e podem ser introduzidos nas células por meio de métodos já bem estabelecidos para expressão de proteínas fluorescentes, como a transfecção e a transdução lentiviral (Bose *et al.*, 2022). Além disso, em relação aos outros métodos, os biossensores são, relativamente, baratos, visto que uma vez comprados podem ser extraídos e armazenados, além de ser possível a amplificação dos mesmos utilizando bactérias competentes. A amplificação possibilita obter uma maior quantidade de DNA plasmidial para, posteriormente, serem inseridos nas células alvo.

Tabela 1 - Exemplos de biossensores fluorescentes do metabolismo celular.

Sensor	Estado metabólico	Vantagens	Fonte
Hyper-DAAO	H ₂ O ₂ intracelular	Repórter de H ₂ O ₂ intracelular que permite a avaliação do estresse oxidativo intracelular. Já utilizado em culturas celulares 3D e modelos pré-clínicos de células de câncer de ovário.	Bose <i>et al.</i> , 2022.

iNap	NADPH:NADP ⁺	Repórter da razão NADPH:NAP ⁺ que permite avaliar a dinâmica dessas duas moléculas em células vivas e em tempo real e proposta como uma ferramenta para estudar o estado metabólico em condições fisiológicas e patológicas.	Tao <i>et al.</i> , 2017.
iATPSnFRs	ATP citosólico e ATP extracelular	Sensores repórteres de ATP citosólico e, também, do ATP que interage com a superfície membrana plasmática a partir de receptores da sinalização purinérgica, permitindo avaliar tanto o papel do ATP intracelular como o do ATP extracelular em diferentes contextos.	Lobas <i>et al.</i> , 2019.
GW1CMV-Perceval	ATP:ADP	Repórter fluorescente da razão intracelular ATP:ADP proposto como uma ferramenta para avaliar o status energético em células vivas, em tempo real e a nível de célula única.	Berg <i>et al.</i> , 2009.

Fonte: Autoria própria.

As barreiras que os biossensores fluorescentes permitem ultrapassar, como avaliar aspectos do metabolismo energético em células vivas, em tempo real e a nível de célula única, são importantes para compreender a adaptação e a dinâmica do metabolismo em resposta a um estímulo ou tratamento, por exemplo, o que por sua vez é de extrema relevância no contexto do câncer, no qual a heterogeneidade metabólica intratumoral - o quanto células que formam um mesmo tumor apresentam *status* energético diferente - é uma das principais características relacionadas à tumorigênese e resistência à quimioterapia.

1.3.1 As análises a nível de célula única

As análises populacionais se baseiam em avaliar uma população a partir de uma amostra que seja representativa - ou seja, que irá refletir a média das características de todos os

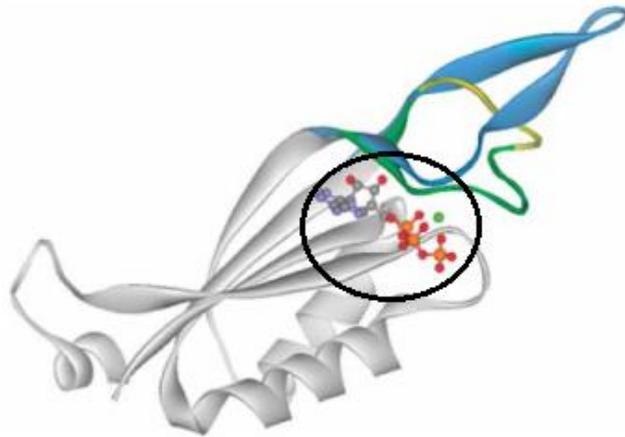
indivíduos desta população. Entretanto, em alguns contextos, como na biologia celular, as análises populacionais podem mascarar diferenças existentes entre as células. Dessa forma, as análises a nível de célula única surgiram, após anos de avanços na área científica, a fim de extrair informações de cada célula presente em uma amostra para identificar características que apresentem significado ou impacto biológico, como na função ou na sobrevivência de uma célula (Joanito *et al.*, 2022). No contexto do estudo do câncer, a heterogeneidade intratumoral é reconhecida como uma característica central no processo de tumorigênese e na progressão da doença (Heath *et al.*, 2016). Como descrito previamente, dados de análises em células únicas demonstram a heterogeneidade entre células tumorais de um mesmo tumor a nível de genoma e transcriptoma, mas ainda são necessários novos métodos e adaptações para avaliar a variabilidade no fenoma - que representa as características que, de fato, impactam na progressão tumoral, como a divisão, a migração e a sobrevivência celular (Lenz *et al.*, 2022). Além disso, é importante ressaltar que os estudos a nível de célula única são relevantes no estudo de células tumorais, visto que, ao contrário de vários outros estados fisiológicos, no câncer, uma célula com comportamento diferente das demais já pode ser suficiente para produzir metástases - que é a principal causa das mortes decorrentes de câncer (Chaffer; Weinberg; 2011). Neste cenário, o uso de biossensores fluorescentes de metabolismo apresentam o potencial de avaliar, por meio da emissão de fluorescência pelas células, a heterogeneidade no estado metabólico entre células de um mesmo tumor e de observar a adaptação do metabolismo das células em resposta a um determinado estímulo ou tratamento.

1.4 PERCEVAL

O plasmídeo GW1CMV-Perceval é um biossensor caracterizado por ser um repórter fluorescente da razão intracelular ATP:ADP. A sua estrutura se baseia na utilização de proteínas fluorescentes circularmente permutadas (cpFPs - do inglês *circularly permuted fluorescent proteins*) fusionadas a uma proteína de origem bacteriana, a GlnK1, que apresenta o mesmo sítio de ligação para ATP e ADP. Ao ligar-se ao sítio ativo da GlnK1, o ATP causa uma alteração na conformação da proteína levando a formação de uma alça, região na qual a cpFP está inserida, como ilustrado na Figura 2, resultando em uma emissão máxima de fluorescência. Por sua vez, o ADP liga-se ao mesmo sítio sem causar a formação da alça e, por isso, produz uma pequena mudança na emissão de fluorescência. A competição pelo sítio ativo entre o ATP e o ADP resulta em diferentes emissões de fluorescência, sendo que a GlnK1 apresenta maior afinidade pelo ATP e, por isso, em concentrações fisiológicas de ATP e ADP, o sítio ativo ficará saturado. Contudo, a competição entre esses dois substratos pelo sítio leva a uma

mudança na conformação do sensor, que desta forma consegue reportar a razão intracelular ATP:ADP (Berg; Hung, 2009).

Figura 2. O constructo utilizado no biossensor Perceval.



Representação de uma subunidade da proteína GlnK1 sem ligantes (em cinza e azul) e com ATP-Mg²⁺ ligado – indicado pelo círculo (em cinza, verde e amarelo). **Fonte:** Berg *et al.*, 2009. Adaptado.

A aplicação e validação do uso do GW1CMV-Perceval em diferentes linhagens celulares pode ser feita a partir da expressão transiente, que pode ser confirmada a partir da visualização da emissão de fluorescência pelas células. Para avaliar a capacidade do sensor de reportar uma mudança na razão intracelular ATP:ADP é possível utilizar inibidores que impactam diretamente na concentração intracelular de ATP. Como exemplo de inibidores da síntese de ATP, pode-se citar a oligomicina, um inibidor da fosforilação oxidativa que atua inibindo a ATP sintase, diminuindo os níveis intracelulares de ATP e, conseqüentemente, diminuindo a razão ATP:ADP - assim como já observado anteriormente (Ofori *et al.*, 2017). Além disso, também é possível utilizar, inibidores da via glicolítica como o fluoreto de sódio (NaF), que inibe diferentes enzimas envolvidas na glicólise como a enzima enolase; ou ainda a 2-deoxiglicose, que atua competindo com a molécula de glicose pelo sítio da hexocinase, e que foi utilizada anteriormente para auxiliar no desenvolvimento do biossensor GW1CMV-Perceval (Berg; Hung, 2009).

Neste contexto, o biossensor Perceval permite avaliar a dinâmica da razão intracelular ATP:ADP em células vivas. Estudos anteriores já utilizaram diferentes biossensores fluorescentes para avaliar o metabolismo de câncer de ovário e observaram, através do uso do plasmídeo GW1CMV-Perceval, que a razão ATP:ADP diminui quando células de diferentes

linhagens de câncer de ovário são tratadas com um meio condicionado derivado de cultura de células tumorais metastáticas no omento, quando comparadas com o uso de meio regular, ressaltando a aplicabilidade desses biossensores no estudo do metabolismo de células tumorais (Bose *et al.*, 2022).

1.5 JUSTIFICATIVA

A desregulação do estado metabólico em células tumorais é reconhecida como uma das *hallmarks* do câncer, sendo uma das características que promovem a tumorigênese e a sobrevivência das células no microambiente tumoral. Entretanto, os principais métodos utilizados, atualmente, para a quantificação de ATP e estudo do metabolismo energético celular necessitam de lise celular e/ou não permitem monitorar em tempo real variações no estado metabólico de células vivas. Neste cenário, o plasmídeo GW1CMV-Perceval apresenta o potencial de acompanhar em tempo real a dinâmica do metabolismo energético em células vivas e individuais e, dessa forma, de contribuir para o entendimento sobre como a heterogeneidade metabólica entre células tumorais pode impactar no crescimento celular e na resistência aos tratamentos.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Validar o uso do biossensor GW1CMV-Perceval para permitir a análise da dinâmica de mudanças no estado metabólico ao longo do tempo em células vivas e avaliar o *status* energético em células de linhagem de glioblastoma humano.

1.6.2 Objetivos específicos

- a) Validar a capacidade de detecção da razão intracelular ATP:ADP do plasmídeo GW1CMV-Perceval a partir da expressão transiente do vetor em células da linhagem HEK-293T e da linhagem tumoral U-251;
- b) Quantificar a intensidade de fluorescência do biossensor por microscopia confocal utilizando inibidores da via glicolítica e da fosforilação oxidativa;
- c) Validar a capacidade do plasmídeo GW1CMV-Perceval de reportar mudança na razão ATP:ADP em resposta à inibição das fases citoplasmática e mitocondrial da respiração celular;

- d) Verificar a aplicação do plasmídeo GW1CMV-Perceval para análises celulares a nível populacional e de células individuais, além de identificar métodos para análises de imagens;
- e) Avaliar o efeito da NTPDase5 na dinâmica da razão ATP:ADP em linhagens de glioblastoma humano.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Os experimentos e resultados preliminares do artigo intitulado “Validação de biossensor fluorescente da razão intracelular ATP:ADP em células vivas” foram redigidos e formatados conforme as normas de publicação do periódico *Experimental Cell Research*, que estão descritas no Anexo A.

Validação de biossensor fluorescente da razão intracelular ATP:ADP em células vivas

Paola Lorenzatto^{a,b}, Danieli Dallemole^{a,b*}, Eloísa Dalsin^{c,d}, Márcia Wink^{c,d},

Guido Lenz^{a,b}

^a Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brasil.

^b Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brasil.

^c Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brasil.

^d Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor correspondente: danieli.dallemole@ufrgs.com (D. Dallemole)

Highlights

- Validação do uso de biossensor repórter da razão intracelular ATP:ADP em células da linhagem celular HEK-293T
- Monitoramento em tempo real de variações no metabolismo energético a nível populacional e a nível de célula única
- Potencial aplicação de nova ferramenta para o estudo do metabolismo energético em células tumorais

Resumo

O *status* energético do metabolismo celular é responsável por regular a atividade de diversas enzimas envolvidas em diferentes processos celulares, como a divisão celular. A hidrólise da molécula de adenosina 5'-trifosfato (ATP) é a principal fonte de energia pelas células, sendo que sua concentração fisiológica impacta diretamente na atividade metabólica e no comportamento das células. Em condições fisiológicas, o processo de obtenção de ATP se inicia pela via glicolítica, que é responsável por oxidar a molécula de glicose e,

posteriormente, enviar seus metabólitos para a cadeia transportadora de elétrons - que é a principal via de obtenção de moléculas de ATP. No entanto, em células proliferativas e em células tumorais, a glicólise se torna a principal fonte de obtenção de ATP - uma desregulação metabólica, denominada efeito Warburg, já bem descrita em tumores. Neste contexto, este trabalho foi proposto como uma forma de validar o uso de um biossensor fluorescente da razão intracelular ATP:ADP e verificar sua funcionalidade em células de linhagens celulares de glioblastoma humano por meio da expressão transiente do vetor e de diferentes métodos de análises de intensidade de fluorescência, como o fluorímetro e a microscopia confocal – além de identificar um método de análise de imagens de fluorescência. Os dados apresentados demonstram a funcionalidade do sensor em diferentes linhagens celulares (normal e tumoral) e sugerem a capacidade do plasmídeo em reportar alterações na razão intracelular ATP:ADP a nível populacional e de células únicas - sendo uma potencial ferramenta para contribuir no estudo do metabolismo de células tumorais.

Palavras-chave: ATP. Perceval. Reprogramação metabólica. Câncer.

1. Introdução

A molécula de adenosina 5'-trifosfato (ATP) constitui a principal fonte de energia nas células, sendo que a concentração intracelular de ATP é responsável por regular a atividade de diversas enzimas envolvidas no metabolismo celular. A principal fonte para obtenção de ATP nas células é a molécula de glicose, que, inicialmente, é oxidada no citoplasma a duas moléculas de piruvato por enzimas da via glicolítica e, em condições favoráveis de oxigênio, os elétrons provenientes das reações glicolíticas são direcionados para a fosforilação oxidativa ou cadeia transportadora de elétrons (CTE) nas mitocôndrias. A CTE é a via metabólica que, ao final, apresenta o maior saldo de moléculas de ATP e, por isso, em condições fisiológicas, as células utilizam majoritariamente a CTE para obter energia a partir da glicose. Por outro lado, em condições patológicas, como no câncer, estudos já demonstraram que células tumorais favorecem a obtenção de ATP a partir da via glicolítica em detrimento da fosforilação oxidativa - fenômeno conhecido como efeito Warburg - não apenas para obter macromoléculas para suportar a proliferação anormal das células tumorais, mas também para regular a expressão gênica de fatores e de enzimas importantes para a sobrevivência e sinalização celular no microambiente tumoral [1,2]. Hoje, a reprogramação metabólica de células tumorais é

reconhecida como uma das principais características envolvidas na tumorigênese e, também, na resistência das células aos tratamentos disponíveis [3]. Apesar da importância do metabolismo energético no contexto das células tumorais, as ferramentas disponíveis, atualmente, para avaliar o metabolismo das células necessitam de lise celular e/ou permitem apenas uma análise populacional, não refletindo o real estado metabólico de todas as células que compõem a amostra. Neste contexto, os biossensores geneticamente codificados foram desenvolvidos como uma proposta de avaliar o *status* energético de células vivas e de acompanhar a dinâmica no estado metabólico a nível populacional e, também, individual [4]. Dessa forma, estes biossensores podem, por exemplo, ser utilizados para analisar mudanças metabólicas em resposta a administração de quimioterápicos e, também, avaliar a contribuição de proteínas e vias de sinalização para o fenótipo metabólico. A análise do metabolismo celular em células vivas a nível de célula única permite verificar alterações metabólicas frente a diferentes estímulos, proporcionando a visualização de características biológicas que podem apresentar significado biológico. Por isso, o presente estudo buscou validar, em células da linhagem celular HEK-293T, o uso do plasmídeo GW1CMV-Perceval, um biossensor fluorescente geneticamente codificado que reporta a razão intracelular ATP:ADP, e identificar a capacidade do plasmídeo em reportar alterações no *status* energético após tratamento com inibidores da via glicolítica e da fosforilação oxidativa. Da mesma forma, buscou-se avaliar a aplicabilidade desta ferramenta em células tumorais a fim de, posteriormente, usá-la para compreender a heterogeneidade do metabolismo energético em linhagens celulares de glioblastoma humano.

2. Materiais e métodos

2.1. Cultura celular e linhagens celulares

A linhagem celular HEK-293T (célula epitelial embrionária de rim humano) foi cultivada em meio DMEM *High glucose*, enquanto as linhagens de glioma humano U-251 (*wild-type* e *knockdown* para o gene ENTPD5) e A-172 (*wild-type*), foram cultivadas em meio DMEM *Low glucose*. As células da linhagem U-251 transformadas com *knockdown* para o gene ENTPD5 foram produzidas previamente (DE CAMPOS, R. P.; DAL SIN, E., dados não publicados). Todos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de

solução antibiótica contendo estreptomicina e penicilina, 0,1% de fungizona e HEPES para regulação do pH. As células foram mantidas em incubadoras a 37°C com 5% de CO₂.

2.2. Obtenção e extração do plasmídeo Perceval

O plasmídeo GW1MV-Perceval (cód. 21737, Fig. S1) foi adquirido comercialmente da AddGene (<https://www.addgene.org/>). O sensor foi enviado na forma de alíquotas em bactérias da espécie *Escherichia coli* competentes transformadas com o plasmídeo. As bactérias transformadas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio Luria Bertani (LB) sólido e antibiótico de resistência - ampicilina 100 µg/mL - para seleção de colônias contendo o plasmídeo. As colônias foram inoculadas para expansão em meio LB líquido e ampicilina 100 µg/mL e mantidas em *shaker* sob agitação constante e temperatura de 37 °C *overnight*. Controles positivos e negativos para o crescimento e seleção bacteriana foram feitos em ambas as etapas. No dia seguinte, o plasmídeo foi extraído por lise alcalina e purificado utilizando protocolo usual de fenol e clorofórmio. A integridade do plasmídeo foi verificada através de corrida em gel de agarose (1%) utilizando uma cuba de eletroforese e tampão TBE 1x. A concentração do plasmídeo foi avaliada no equipamento NanoDrop Lite UV Visible Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Transfecção

Para a fluorimetria, células HEK-293 foram plaqueadas em placas de 96 poços em diferentes densidades celulares (1, 5, 10 e 20 mil células por poço). Para a microscopia confocal, as linhagens celulares HEK-293 e U-251 foram plaqueadas em placa circular com fundo de vidro dividida em quatro quadrantes (30 mil células por poço), previamente tratada com polilisina 0,1 mg/mL. A transfecção foi realizada 24h após o plaqueamento utilizando Lipofectamina (Lipofectamine Reagent) seguindo as recomendações do fabricante, ou o polímero linear Polietilenimina (PEI, 25 KDa), de acordo com protocolo previamente estabelecido. Para a transfecção com PEI foi utilizada a proporção de 100 ng de DNA: 0,6 µL de PEI a 1 mg/mL e meio suplementado com 5% de soro fetal bovino sem antibiótico e antifúngico. O meio das células transfectadas foi trocado entre 16 a 18 horas após a transfecção adicionando meio suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótica contendo estreptomicina e penicilina, 0,1% de fungizona e HEPES. A emissão de fluorescência pelas

células foi monitorada após 24h e as análises foram realizadas entre 48 a 72h após transfecção com Perceval.

2.4. Tratamento com inibidores da síntese de ATP

Após a transfecção, as células foram tratadas com oligomicina a 20 $\mu\text{g/mL}$ (0,025 mM) ou NaF a 10 mM, durante 3 minutos, conforme descrito previamente (Arai *et al.*, 2018). Após este período, o tratamento foi retirado e as células mantidas em meio de cultivo ou tampão (PBS - do inglês *Phosphate-buffered saline* ou HBSS - do inglês *Hanks' Balanced Salt Solution*) para obtenção de imagens ou avaliação da fluorescência em fluorímetro conforme descrito nos itens 2.5 e 2.6. Grupos que não receberam nenhum tratamento ou foram tratados com dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% foram utilizados como controle.

2.5. Análise populacional (fluorimetria)

A intensidade de fluorescência de células HEK-293 transfectadas com Perceval foi quantificada através do espectrofotômetro Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific) localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As leituras foram realizadas em comprimentos de onda de excitação de 430 nm e 490 nm com emissão em 520 nm antes (t0) e 10 (t10), 20 (t20) e 30 (t30) minutos após tratamento com oligomicina ou NaF. Os valores de intensidade de fluorescência obtidos foram subtraídos da fluorescência basal (grupo controle), quando indicado, e utilizados para calcular a razão ATP/ADP (490/430).

2.6. Microscopia confocal

A análise por microscopia confocal foram realizadas de 48 a 72 horas após a transfecção com Perceval utilizando microscópio *Olympus FV1000*, localizado no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O microscópio estava equipado com lasers de excitação em 405 nm e 473 nm e emissão em 520 nm, os quais foram utilizados para a análise da razão ATP/ADP. Todos os parâmetros foram ajustados pelo técnico responsável. As imagens foram obtidas antes (t0) e 10 (t10), 20 (t20) e 30 (t30) minutos após o tratamento com oligomicina ou NaF. Grupos controles também foram analisados, como mencionado anteriormente.

2.7. Análise de imagens

As fotos obtidas no microscópio confocal foram analisadas usando o software ImageJ/Fiji, no qual a seleção e a média de intensidade de fluorescência de cada célula foram quantificadas através da ferramenta *threshold* para cada condição, assim como descrito previamente (Shihan et al., 2021). Os lasers de excitação utilizados foram de 473 nm, que corresponde ao ATP, e de 405 nm, que corresponde ao ADP. Com os valores, foi calculada a razão 473/405 (ATP/ADP).

2.8. Análise estatística

Os dados foram plotados em planilhas no programa Excel (Microsoft Office Excel), onde também foram calculadas as razões ATP/ADP. Posteriormente, os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 8. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA de uma via e as múltiplas comparações foram avaliadas por pós-teste de Tukey. $P < 0.05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1. Obtenção do plasmídeo Perceval

Os plasmídeos foram extraídos de colônias bacterianas isoladas selecionadas a partir de seleção com antibiótico de resistência indicado na sequência do plasmídeo (Fig. S1) e os que se apresentavam íntegros após eletroforese em gel de agarose, além de adequada razão de pureza, foram utilizados nas transfecções. A concentração de plasmídeo após a extração variou de 1,86 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 2,08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.2. Validação do uso do plasmídeo Perceval em células HEK-293T

A linhagem HEK-293T é amplamente utilizada em experimentos para a expressão transiente e estável de proteínas e repórteres fluorescentes. Dessa forma, células HEK-293T foram utilizadas para a transfecção com o plasmídeo Perceval. Primeiramente, dois protocolos de transfecção foram avaliados - lipofectamina e PEI - a fim de verificar diferenças na eficiência de transfecção e, simultaneamente, avaliar o protocolo com menor citotoxicidade. Como pode

ser observado na Fig. S2, a melhor eficiência de transfecção foi obtida utilizando o polímero linear PEI, ao invés da lipofectamina. Além do teste comparativo entre protocolos de transfecção, ajustes nas proporções de PEI e DNA plasmidial foram realizados, sendo os melhores resultados obtidos quando da utilização da proporção de 1:6 de DNA:PEI. Isso permitiu a obtenção de um maior número de células fluorescentes, mantendo um baixo nível de citotoxicidade, o que viabilizou a realização de testes subsequentes. A partir da padronização destes parâmetros foi realizado um teste para avaliar a aplicação do repórter em análises celulares populacionais, em fluorímetro. As células foram plaqueadas em baixa densidade (1000 células por poço em placa de 96 poços) e a emissão de fluorescência foi quantificada através de leituras em varredura, onde foram aplicados os comprimentos de onda de 430 nm e 490 nm para excitação (para detectar ADP e ATP, respectivamente) e 520 nm para emissão. As leituras foram realizadas antes e após tratamento com os inibidores de síntese de ATP, sendo que após o tratamento as células foram mantidas em meio de cultivo. O meio de cultivo foi utilizado a fim de promover as condições ideais para que as células estivessem viáveis ao longo da análise. Contudo, não foi possível observar diferenças entre as razões de fluorescência das células transfectadas e a condição-controle, ou seja, células sem a inserção do plasmídeo (Fig. S3). Essa observação pode ser atribuída à autofluorescência do meio de cultivo e à baixa densidade de células transfectadas. Na tentativa de aumentar a eficiência da transfecção e reduzir ainda mais os efeitos tóxicos do agente de transfecção, diferentes densidades de células da linhagem HEK-293T (5, 10 e 20 mil células por poço em placa de 96 poços) foram testadas. Além disso, as leituras de fluorescência foram realizadas utilizando tampão PBS ou HBSS. O melhor resultado foi observado na densidade de 20 mil células por poço. Nestas condições, observou-se um aumento na eficiência da transfecção (maior número de células fluorescentes). Por outro lado, o tampão com menor interferência para realizar as leituras de fluorescência foi o HBSS, o qual é incolor e capaz de manter a osmolaridade e pH na cultura de células. Dessa forma, foi possível verificar diferença entre a emissão de fluorescência pelas células transfectadas em relação à condição-controle. No tempo 0, observou-se que os grupos com células transfectadas (DMSO, oligomicina e NaF) apresentaram uma média da razão intracelular ATP:ADP semelhante - o que era esperado, visto que neste momento os inibidores ainda não tinham sido adicionados. Após o tratamento, observou-se uma diminuição na razão ATP:ADP, principalmente no grupo tratado com NaF ao longo do tempo. Porém, também foi observada uma redução na razão ATP:ADP no grupo DMSO e em menores proporções nas células tratado com oligomicina (Fig. 1). O valor da fluorescência basal obtida no branco foi descontado dos demais valores de fluorescência, o que reforça a capacidade do método em

detectar a fluorescência nas células transfectadas. A partir dos resultados das análises populacionais pode-se sugerir que o repórter fluorescente Perceval foi sensível à inibição pelo NaF, porém esses dados ainda precisam ser confirmados em experimentos futuros, bem como explorar os motivos pelos quais ocorreu a redução na razão de fluorescência ao longo do tempo no grupo DMSO.

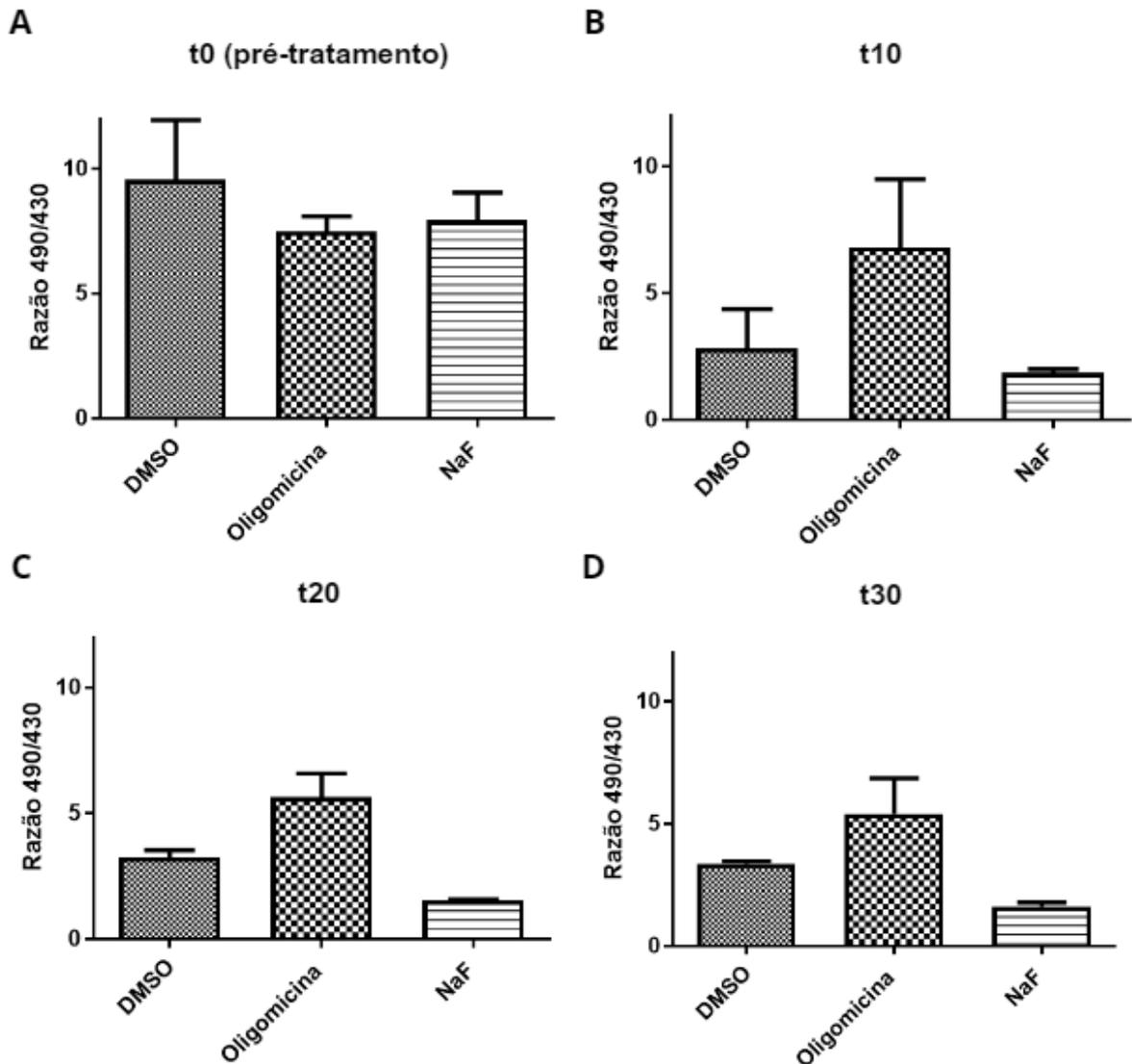


Fig. 1. Média das razões da intensidade de fluorescência. Leituras realizadas por fluorímetro em tampão HBSS em comprimentos de onda de excitação de 490 nm e 430 nm e de emissão de 520 nm pré e pós-tratamento com oligomicina (0,025 mM) e NaF (10 mM) em células HEK-293T transfectadas com Perceval. (A) Média das razões da intensidade de fluorescência no tempo 0, tempo 10 (B), tempo 20 (C) e tempo 30 (D). n=1, em duplicata.

Paralelamente, células das linhagens U251 e A172 (glioma) também foram transfectadas com o plasmídeo Perceval, utilizando os dois protocolos de transfecção anteriormente descritos. Diferentemente do que foi observado para células HEK-293T, a utilização de PEI ou de uma

maior densidade de células não aumentou o número de células fluorescentes. Devido à baixa densidade de células expressando o repórter fluorescente, não foi possível realizar as análises por fluorimetria.

3.3. *Análise populacional através de microscopia confocal*

A emissão de fluorescência por células HEK-293T transfectadas com o plasmídeo Perceval também foi avaliada por microscopia confocal como uma proposta, inicialmente, de verificar a dinâmica na razão intracelular ATP:ADP a nível de célula única e, posteriormente, como uma forma de avaliar as células a nível populacional, devido às dificuldades enfrentadas ao longo dos experimentos com o fluorímetro. Para as análises, a transfecção foi realizada com uma densidade de 30 mil células por poço, uma densidade menor (40% de confluência no momento da transfecção) - considerando a área do poço - em comparação a utilizada nas placas de 96 poços (>90% no momento da transfecção). Uma menor densidade de células foi utilizada visando que a confluência na placa não estivesse alta no momento da análise - ao contrário do que se espera para as análises com o fluorímetro - visto que o principal objetivo com o uso da microscopia confocal foi avaliar a dinâmica na razão intracelular ATP:ADP a nível de célula única e uma confluência muito alta não permitiria visualizar a morfologia celular e analisar de forma confiável a fluorescência em cada célula. Para as análises, as células foram transportadas até o Centro de Microscopia e Microanálise, sendo mantidas, durante todo o trajeto, em meio DMEM *high glucose* suplementado. Ao chegar ao CMM, as células foram incubadas em estufa a 37°C e foram retiradas apenas para realizar as leituras no microscópio. Entretanto, a estufa disponível estava sem cilindro para injeção de CO₂ e, por isso, as células ficaram nas condições ideais de temperatura, mas não de CO₂. As fotos foram capturadas antes e após o tratamento com oligomicina e NaF, sendo que ao longo das leituras as células foram mantidas em meio DMEM suplementado e em câmara a 37°C, que faz parte do aparato do microscópio confocal - visando mantê-las viáveis ao longo das leituras. A emissão de fluorescência foi detectada com sucesso após a excitação nos dois comprimentos de onda respectivos ao ATP e ao ADP (Fig. 2), confirmando, mais uma vez, a funcionalidade do plasmídeo em reportar a fluorescência correspondente ao ATP e ADP, e a possibilidade de calcular a razão intracelular ATP:ADP.

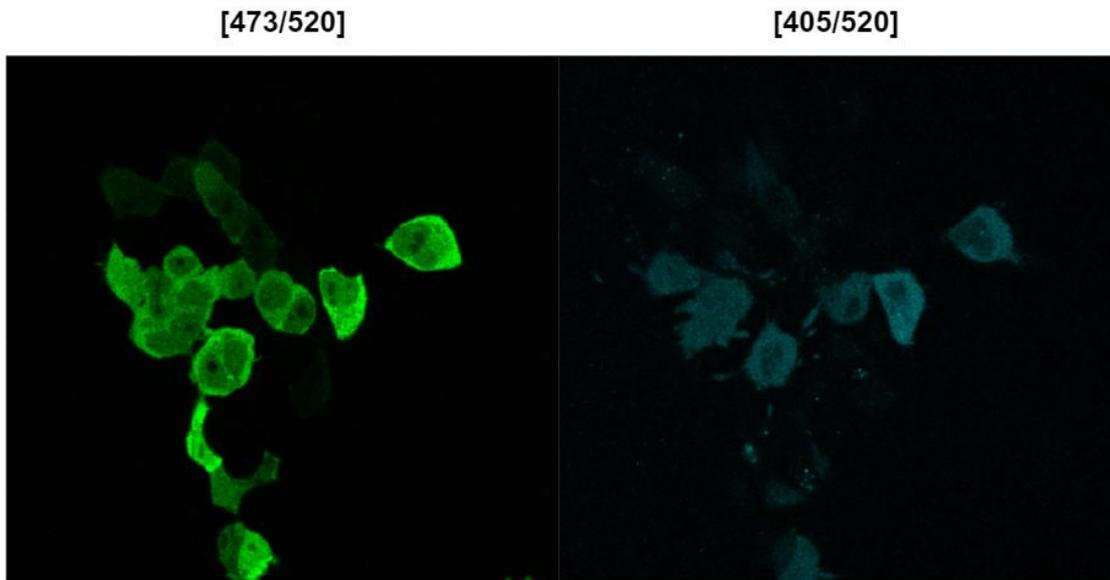


Fig. 2. Emissão de fluorescência em células HEK-293T expressando transientemente Perceval. Imagens capturadas no microscópio confocal de células HEK-293T transfectadas com Perceval. Os lasers de excitação utilizados foram de 473 nm, que corresponde ao ATP, e de 405 nm, que corresponde ao ADP, emissão fixa em 520 nm para as duas leituras.

As fotos obtidas com o microscópio confocal nos permitem visualizar a fluorescência, mas para obter o valor da intensidade de fluorescência emitida por cada célula foram aplicados métodos de quantificação. Por isso, a intensidade de fluorescência de cada célula foi quantificada utilizando a ferramenta *threshold* do software ImageJ/Fiji, que identifica objetos na imagem através da intensidade dos pixels e ajuda a selecionar cada célula para mensurar a média da intensidade de fluorescência em toda área selecionada. Em seguida, a razão intracelular ATP:ADP foi calculada considerando os valores de fluorescência obtidos em cada comprimento de onda (Fig. 3). O uso do microscópio confocal permitiu observar, mais uma vez, a dinâmica da razão intracelular ATP:ADP a nível populacional. Devido à dificuldade de analisar as mesmas regiões após os tratamentos, as células não são as mesmas em cada grupo ao longo do tempo e, por isso, a quantificação da intensidade de fluorescência para cada célula foi realizada no software ImageJ/Fiji e a diferença entre os grupos foi avaliada a partir da média da razão intracelular ATP:ADP entre o conjunto de células analisadas. A partir disso, observou-se que, no tempo 0 (pré-tratamento), não houve diferença estatística na razão ATP:ADP entre os grupos oligomicina e NaF - o que era esperado, visto que todos os grupos contêm células transfectadas ainda sem adição dos inibidores - mas entre os grupos controle (DMSO) e NaF, os dados sugerem uma diferença.

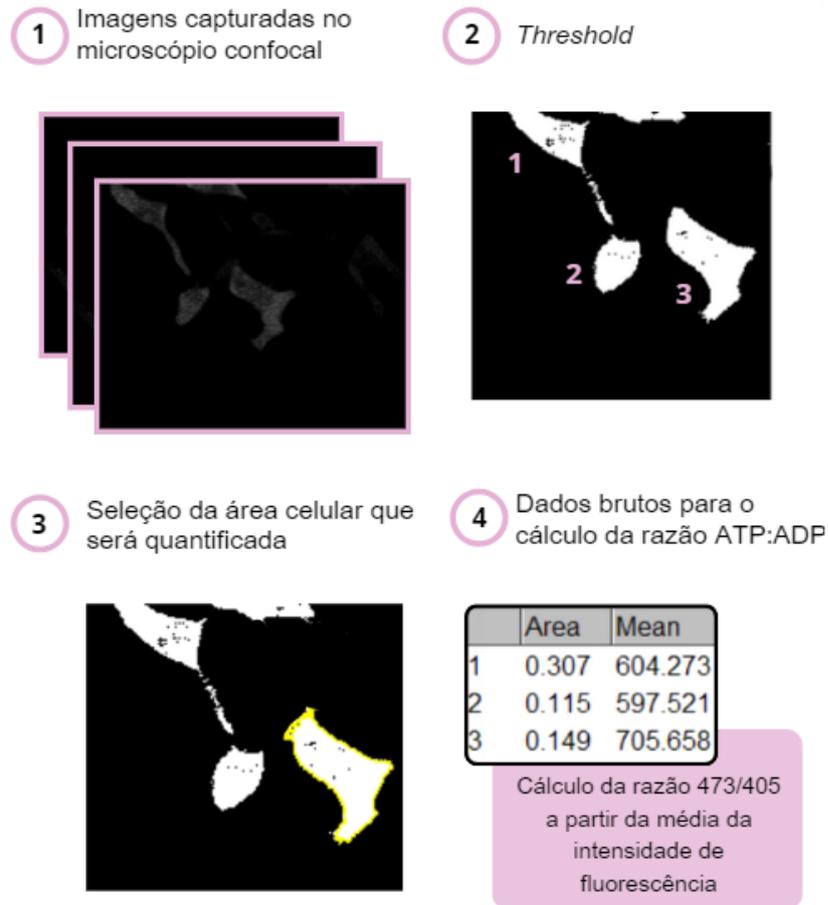


Fig. 3. Método de análise de imagens de fluorescência do microscópio confocal. Esquema representativo do passo a passo realizado no ImageJ/Fiji para a quantificação da intensidade de fluorescência emitida pelas células a partir das fotos obtidas com o microscópio confocal.

Além disso, observou-se que 20 minutos após o tratamento com os inibidores da via glicolítica (NaF) e da fosforilação oxidativa (oligomicina), há diferença entre o grupo controle e os grupos tratados. Pode ser observado que há uma tendência de redução na razão ATP:ADP no grupo tratado com oligomicina, mas, diferente do que foi observado com o fluorímetro, não é possível observar uma diminuição no grupo tratado com o NaF, visto que a média da razão intracelular ATP:ADP neste grupo permaneceu semelhante mesmo após o tratamento (Fig. 4). Vale ressaltar, ainda, que a análise da variação da razão intracelular ATP:ADP em células únicas ao longo do tempo não foi possível, neste caso, devido à dificuldade em manter as mesmas regiões da placa antes e após o tratamento no campo de captura do microscópio, e isso também impacta no número total de células analisadas nos tempos analisados após o tratamento com oligomicina e NaF, assim como no grupo controle. Neste contexto, os resultados obtidos sugerem que o plasmídeo tem capacidade de reportar mudanças na razão intracelular ATP:ADP, visto que houve diminuição na razão após o tratamento com a oligomicina (Fig. S4). No entanto, ainda

são necessários mais experimentos para confirmar a capacidade do sensor em reportar uma alteração na razão frente aos inibidores ou a condições metabólicas distintas.

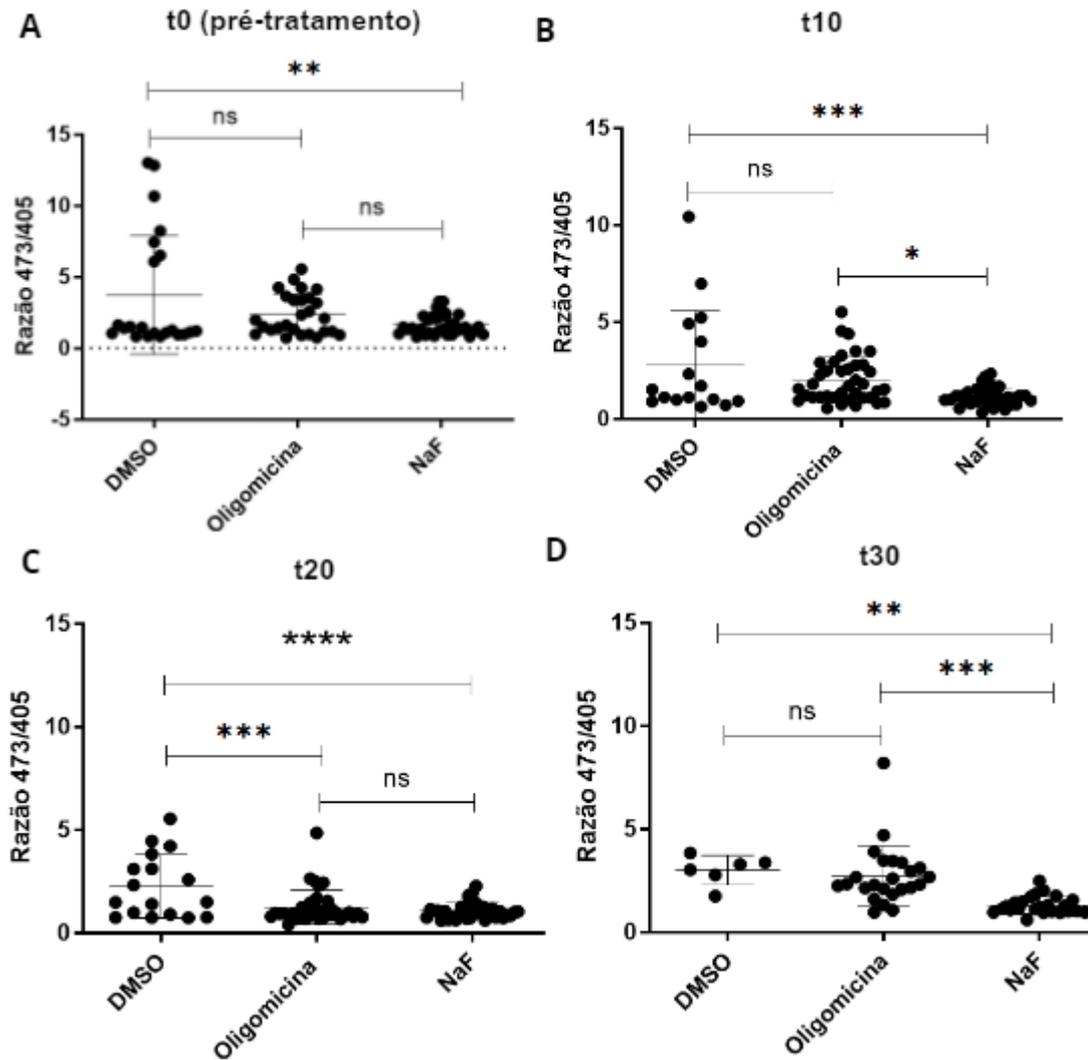


Fig. 4. Média das razões da intensidade de fluorescência. Leituras realizadas com excitação em 473 nm e 405 nm pré e pós-tratamento com oligomicina (0,025 mM) e NaF (10 mM) em células HEK-293T transfectadas com Perceval nos tempos 0 (pré-tratamento), 10, 20 e 30 minutos (pós-tratamento). ANOVA e teste de Tukey foram aplicados em todos os gráficos. (A) Razão da intensidade de fluorescência no tempo 0, tempo 10 (B), tempo 20 (C) e tempo 30 (D). A diferença estatística foi considerada quando $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) ou $p < 0.0001$ (****). $n=2$.

Observou-se, também, uma heterogeneidade não esperada, principalmente, entre as células no grupo controle (DMSO). É possível observar, pelo menos, duas subpopulações de células com razões ATP:ADP diferentes (Fig. 4). Por isso, uma análise da morfologia das células foi realizada para identificar se as células que apresentaram a razão ATP:ADP menor estariam com

morfologia compatível com células viáveis. Observou-se que células com menor razão intracelular ATP:ADP (que estão na parte inferior do gráfico) apresentam sinais de estresse e morte, como morfologia mais arredondada e diversos grânulos no citoplasma, enquanto células que estão mais acima no gráfico, ou seja, que apresentam uma razão maior, têm uma morfologia esperada para células viáveis de HEK-293T (Fig. 5). Por isso, em paralelo à análise do valor da razão intracelular ATP:ADP e da morfologia das células, foi definido um limiar a partir do grupo controle, no tempo 0. O limiar foi calculado utilizando a média das razões de ATP:ADP mais um desvio padrão das células na parte inferior do gráfico e isso foi aplicado aos outros grupos com o intuito de excluir das análises células que não estão viáveis antes dos tratamentos. O limiar calculado foi de 1,408, sendo que, no grupo controle, 50% do total de células fluorescentes permaneceu acima deste valor. Aplicando o limiar no grupo oligomicina, observou-se que cerca de 55% das células permaneceram acima deste valor, enquanto no grupo NaF 53% das células fluorescentes ficaram acima do mesmo. A partir desta análise, é possível identificar e retirar das análises células não viáveis, como ilustrado na Fig. S5, - que são as células que apresentam razão intracelular ATP:ADP abaixo do limiar definido. Com a exclusão das células, não foi observada diferença estatística entre os grupos oligomicina e NaF - o que era esperado, já que neste momento ainda não há adição dos inibidores. Contudo, a diferença significativa entre o controle e os outros grupos permaneceu. Isso possivelmente foi em decorrência da heterogeneidade entre as células no grupo DMSO. Portanto, definir um limiar se faz necessário para considerar nas análises apenas células viáveis, que irão refletir de forma mais confiável a dinâmica da razão ATP:ADP, assim como novas investigações são necessárias para avaliar as fontes de heterogeneidade entre as células no grupo controle antes do tratamento.

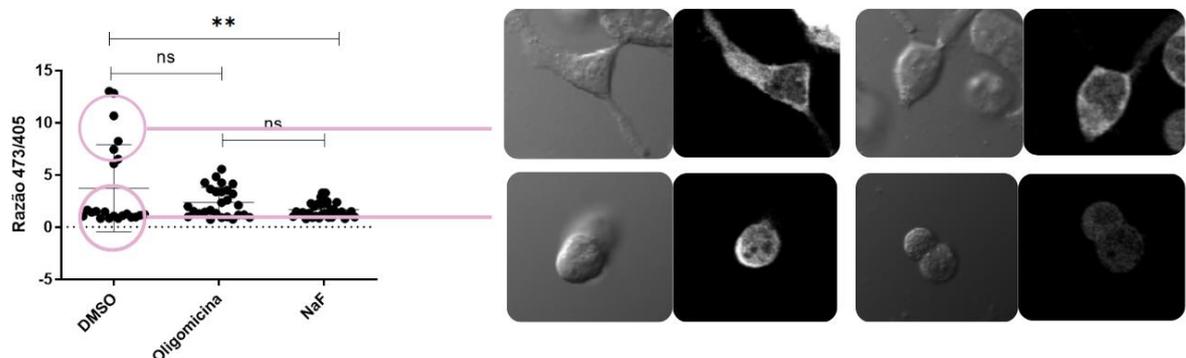


Fig. 5. Análise morfológica de viabilidade celular. Análise da morfologia de células da linhagem celular HEK-293T transfectadas com Perceval em relação aos seus respectivos valores de razão intracelular ATP:ADP.

3.4. Aplicação do biossensor *Perceval* em células tumorais e análise a nível de célula única

A detecção de fluorescência por microscopia confocal também foi avaliada em células tumorais em linhagem de glioblastoma humano (U-251) - selvagens e transformadas com *knockdown* para o gene *ENTPD5* - que codifica a enzima NTPDase5. As células foram transfectadas e mantidas nas condições descritas anteriormente para a linhagem celular HEK-293T. As células *wild-type* apresentaram baixa eficiência na transfecção, resultando em um número insuficiente de células para realizar uma análise populacional, como mencionado anteriormente. Por outro lado, neste caso, apesar da dificuldade em manter o campo de análise ao longo do experimento, foi possível acompanhar a variação da razão ATP:ADP a nível de célula única antes e após o tratamento com inibidor da ATP sintase, a oligomicina. Porém, isso foi possível em apenas uma única célula. As imagens sugerem uma diminuição na razão devido a um aumento intracelular de ADP após tratamento com oligomicina, que pode ser visualizado pelo aumento da fluorescência em comprimento de onda de excitação de 405 nm (Fig. 6). Contudo, a quantificação da intensidade de fluorescência demonstrou um aumento na razão após o tratamento com oligomicina.

A transfecção em células silenciadas para a enzima NTPDase5 não foi bem sucedida, visto que após a transfecção com o plasmídeo *Perceval* não foi observada nenhuma célula fluorescente. Por isso, as análises não foram realizadas, sendo necessário outros testes para avaliar adaptações do protocolo com o objetivo de obter células transformadas expressando transientemente o plasmídeo *Perceval*.

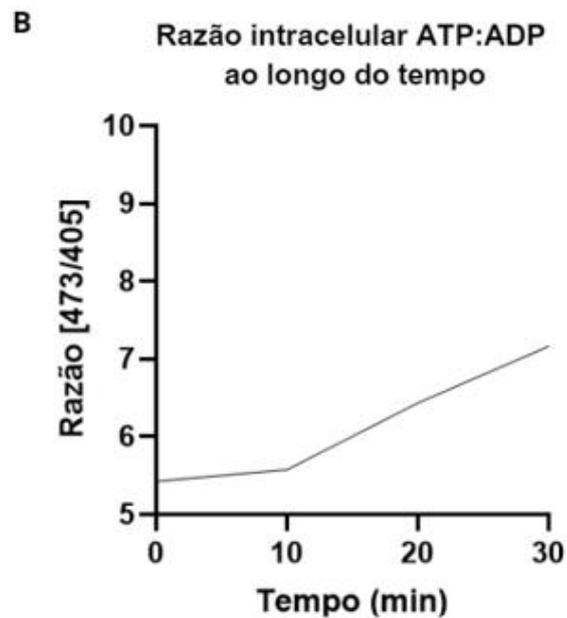
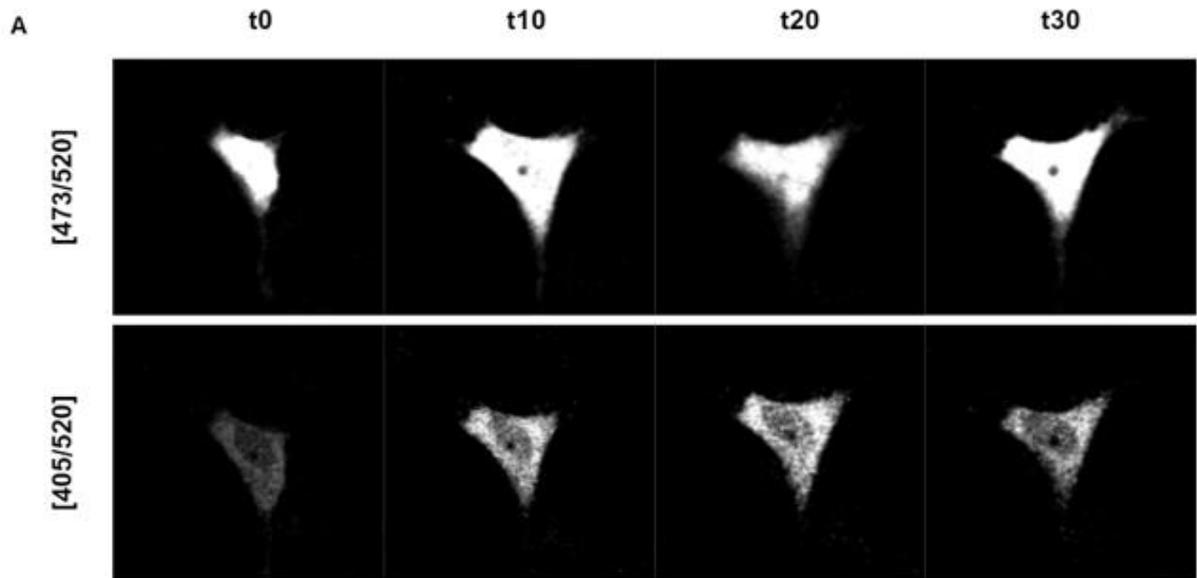


Fig. 6. Análise a nível de célula única em célula da linhagem U-251 *wild-type* com expressão transiente de Perceval. Imagens capturadas em microscópio confocal demonstrando a variação na emissão de fluorescência em resposta ao tratamento com oligomicina com excitação nos comprimentos de onda correspondentes ao ATP e ADP (473 nm e 405 nm, respectivamente) em célula da linhagem celular U-251 *wild-type* transfectada com Perceval. (A) Imagens obtidas no microscópio confocal de célula da linhagem U-251 *wild-type* transfectada com Perceval antes (t0) e após (t10, t20 e t30) o tratamento com oligomicina (0,025 mM). (B) Quantificação da razão da intensidade de fluorescência emitida pela célula nas imagens em (A) ao longo do tempo.

4. Discussão

Os biossensores fluorescentes de metabolismo surgiram como uma nova classe de ferramentas para monitorar em tempo real alterações no *status* energético e com grande potencial de aplicação no estudo de células únicas [5]. Estudos anteriores demonstraram a aplicabilidade de um biossensor de ATP em monitorar em tempo real o metabolismo energético de neurônios e, também, em avaliar o impacto no metabolismo da regulação de determinados genes em células beta pancreáticas e suas consequências na função celular [6, 7]. Diante disso, a validação do uso do plasmídeo GW1CMV-Perceval, que é um repórter da razão intracelular ATP:ADP, foi proposta como uma forma de avaliar a resposta do biossensor frente a diferentes inibidores do metabolismo celular para, posteriormente, aplicar esta ferramenta no estudo do metabolismo de linhagens tumorais de glioblastoma humano. Primeiramente, avaliou-se a eficiência de dois reagentes de transfecção em facilitar a inserção do plasmídeo no meio intracelular. Os primeiros testes demonstraram que, nas mesmas condições de plaqueamento, o PEI obteve uma eficiência maior na transfecção em relação a Lipofectamina. Esta observação vai em direção oposta ao trabalho de Bose *et al.* [8], no qual diferentes linhagens células de câncer de ovário foram eficientemente transfectadas com repórteres fluorescentes geneticamente codificados para avaliar o metabolismo celular, utilizando Lipofectamina. O PEI e a Lipofectamina são reagentes de transfecção que formam complexos com material genético, o qual possui carga negativa devido aos grupos fosfatos, via interação eletrostática com a carga positiva que estes reagentes de transfecção apresentam. Contudo, o PEI apresenta-se como um polímero linear, enquanto a Lipofectamina é um lipídio catiônico, capaz de formar estruturas lipossomais. Estas diferenças, aliado à origem celular, número de passagem e condições de cultura podem refletir em distintas taxas de transfecção entre os trabalhos que exploram essas metodologias [9]. Além disso, devido a transfecção ser um processo estressante para as células, quando os reagentes de transfecção permanecem muito tempo em contato com as células podem provocar lesões à membrana, causando a morte celular [10]. Por isso, avaliar a citotoxicidade é um fator importante para obter um maior número de células fluorescentes e viáveis. Dessa forma, a proporção de DNA:PEI 1:6 apresentou um maior número de células fluorescentes, como já relatado anteriormente [11]. A partir dos ajustes de protocolo descritos, a emissão de fluorescência por células HEK-293T - normalmente utilizada para avaliar a expressão de proteínas fluorescentes [12] - transfectadas com o plasmídeo Perceval foi avaliada, primeiramente, por espectroscopia de fluorescência a fim de otimizar a quantificação da razão

intracelular ATP:ADP, visto que é uma metodologia de fácil acesso amplamente utilizado em laboratórios. Neste contexto, verificou-se que o fluorímetro é capaz de detectar diferença na fluorescência emitida entre células transfectadas e não transfectadas com o plasmídeo quando as células são plaqueadas em alta densidade (confluência >90% no momento da transfecção), tornando as leituras mais fidedignas. Os dados preliminares demonstraram, também, que células transfectadas com o plasmídeo diminuem sua razão ATP:ADP em resposta ao tratamento com os inibidores da síntese de ATP, sendo que o NaF, inibidor da enzima enolase que compõem a via glicolítica, parece ser mais potente em diminuir este valor em células da linhagem celular HEK-293T. Tais dados sugerem que o sensor é capaz de reportar uma alteração na razão intracelular ATP:ADP em resposta a tratamentos. No contexto do uso do fluorímetro, é importante ressaltar que as células transfectadas com Perceval não devem ser mantidas em meio DMEM com *phenol red* no momento das leituras, visto que este indicador de pH é a principal fonte de autofluorescência durante a obtenção de imagens e o seu espectro de emissão de fluorescência pode coincidir com o espectro de detecção do biossensor, principalmente no comprimento de onda de excitação de 430 nm - que detecta o ADP - [13, 14], podendo superestimar o valor obtido. Por isso, observou-se que a melhor forma de realizar as leituras no fluorímetro é manter as células em tampão HBSS - uma solução rica em sais inorgânicos e que contém glicose como fonte de energia, mantendo as células viáveis por mais tempo quando as mesmas estão fora de condições ideais de cultivo [15].

A análise da emissão de fluorescência pelas células utilizando o microscópio confocal foi realizada com o objetivo de prover mais uma forma de avaliar a razão ATP:ADP a nível populacional nas células transfectadas com Perceval e, também, de possibilitar o estudo da dinâmica da razão intracelular ATP:ADP a nível de célula única. Os dados obtidos demonstraram, mais uma vez, a capacidade do plasmídeo em reportar a razão intracelular ATP:ADP em células HEK-293T e, também, em células U-251 *wild-type*. Além disso, foi possível avaliar, utilizando a linhagem celular U-251 *wild-type* a variação da razão intracelular ATP:ADP em célula única em resposta ao tratamento com oligomicina, no qual as fotos sugerem um aumento na fluorescência correspondente ao ADP e uma leve diminuição no ATP após o tratamento. Apesar disso, a quantificação da razão intracelular ATP nessa célula indicou um aumento na razão após o tratamento, possivelmente decorrente da alta exposição do laser de excitação. Vale destacar que na microscopia confocal, ao contrário do que foi observado nas leituras no fluorímetro, a utilização de meio com *phenol red* não influenciou as leituras realizadas no microscópio confocal, visto que as células do grupo controle não apresentaram emissão de fluorescência (Fig. S6). Isso permite a manutenção das células em ambiente similar

ao qual normalmente são expostas na rotina de cultivo, sendo um ponto favorável à manutenção da viabilidade celular e a caracterização do metabolismo celular.

Por outro lado, um dos desafios encontrados ao longo dos experimentos foi a dificuldade em obter uma alta eficiência de transfecção com o sensor em células da linhagem de glioblastoma utilizando o mesmo protocolo que foi usado com a linhagem celular HEK-293T, o que impossibilitou as análises populacionais com a linhagem celular de glioblastoma humano. O processo de transfecção pode ser mais citotóxico para algumas linhagens do que para outras, sendo a citotoxicidade do reagente de transfecção um dos principais obstáculos para obter um número maior de células fluorescentes [16]. Além disso, a variação da sensibilidade entre diferentes linhagens celulares a métodos de transfecção utilizando vetores não virais já foi descrita anteriormente [17, 18], sendo necessário ajustes nos protocolos de acordo com a linhagem em estudo. Por isso, para obter uma maior eficiência de transfecção com o plasmídeo Perceval em linhagens celulares de glioblastoma são necessários outros testes para adaptar o protocolo - como testar diferentes proporções de DNA plasmidial e do reagente de transfecção, tempos de incubação com o reagente distintos e diferentes densidades de células.

Para a análise de célula única, observou-se que uma menor densidade de células deve ser utilizada no momento da transfecção, visto que uma densidade maior irá resultar em uma confluência alta, dificultando a diferenciação entre os limites e a morfologia de uma célula e outra. Ao longo das leituras realizadas no microscópio confocal, a análise de células individuais se apresentou como uma possível limitação pois, apesar do equipamento permitir a marcação da região da placa na qual as células foram fotografadas, um pequeno deslocamento na placa - que pode ocorrer durante o tratamento, por exemplo - é suficiente para que essa marcação seja perdida, dificultando voltar às mesmas regiões e fotografar as mesmas células ao longo do tempo. Pelo mesmo motivo, analisar as mesmas células antes e após o tratamento durante as análises populacionais foi, também, uma limitação.

A partir das análises realizadas com as fotos obtidas no microscópio confocal, notou-se uma heterogeneidade em relação aos valores da razão intracelular ATP:ADP nos grupos de estudo antes da adição do tratamento - quando o esperado era que as células apresentassem valores mais homogêneos entre si, visto a não perturbação da condição fisiológica. Por isso, foi realizada uma análise da morfologia celular em relação ao valor da razão, que mostrou que células na parte inferior do gráfico apresentam sinais de estresse ou morte celular, enquanto células na parte superior do gráfico - que têm um valor de razão superior - apresentam uma morfologia esperada para células viáveis. Embora ainda não exista um consenso quanto à concentração fisiológica de ATP e ADP, estudos sugerem que a razão intracelular ATP:ADP,

em células eucariontes, pode variar de 1 a 1000 [19, 20]. Por isso, a partir da análise morfológica das células, foi definido um limiar para identificar células com morfologia similar ao de células não tratadas - e, potencialmente viáveis - nas análises, o que é de suma importância, visto que células não aderidas na placa e que, possivelmente, podem estar em processo de morte celular também podem emitir fluorescência, interferindo nos resultados. Contudo, neste caso, mesmo após a exclusão das células potencialmente não viáveis, o perfil dos resultados não foi alterado. Como já descrito anteriormente, uma adaptação do biossensor Perceval foi proposta devido a possibilidade de o plasmídeo não ser capaz de detectar a razão ATP:ADP em concentrações fisiológicas, mas ser capaz de reportar inibições metabólicas que levem a alterações significativas na razão intracelular ATP:ADP [6]. Por isso, mais estudos são necessários para avaliar a capacidade do plasmídeo em reportar a razão intracelular ATP:ADP em diferentes condições.

Neste sentido, o presente estudo buscou demonstrar a sua aplicabilidade do plasmídeo Perceval no estudo de células tumorais. Apesar de demonstrarem potencial para estas aplicações, o maior desafio é a necessidade de adaptações de protocolo para cada condição experimental. Portanto, este trabalho foi uma investigação preliminar para demonstrar a aplicabilidade dos biossensores e o potencial dos mesmos em contribuir para elucidar questões acerca do metabolismo energético a nível populacional e de célula individual em condições fisiológicas e patológicas.

5. Conclusão

Este trabalho demonstrou a funcionalidade do biossensor GW1CMV-Perceval em diferentes linhagens celulares (normal e tumoral) e o seu potencial em reportar mudanças no estado metabólico celular em resposta a tratamentos com inibidores - contribuindo para o entendimento acerca dos biossensores de metabolismo, que podem servir, futuramente, para contribuir no estudo do metabolismo energético de células tumorais. Entretanto, ainda são necessárias investigações para compreender melhor as limitações do uso desses biossensores bem como adaptações de metodologias para a sua ampla utilização.

Referências

- [1] N. Pavlova, J. Zhu et al., The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging, *Cell Metab.* 34 (2022) 355-377. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.01.007>.
- [2] N. Chandel, Metabolism of Proliferating Cells, *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 13 (2021) a040618. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040618>.
- [3] D. Hanahan and R. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell* 144 (2011) 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [4] H. Imamura, K. Togawa et al., Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators, *Proc. Acad. Sci USA* 106 (2009) 15651-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904764106>.
- [5] S. Shi, E. Ang et al., In vivo biosensors: mechanisms, development, and applications, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 45 (2018) 491-516. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2004-x>.
- [6] M. Tantama, J. Martínez-François et al., Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2550. <https://doi.org/10.1038/ncomms3550>.
- [7] J. Ofori, V. Salunkhe et al., Elevated miR-130a/miR130b/miR-152 expression reduces intracellular ATP levels in the pancreatic beta cell, *Sci. Rep.* 7 (2017) 44986. <https://doi.org/10.1038/srep44986>.
- [8] S. Bose, H. Yao et al., Using genetically encoded fluorescent biosensors to interrogate ovarian cancer metabolism, *J. Ovarian. Res.* 15 (2022) 114. <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01046-5>.
- [9] A. Fus-Kujawa, P. Prus et al., An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells *in vitro*, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021) 701031. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701031>.

- [10] T. Kim and J. Eberwine, Mammalian cell transfection: the present and the future, *Analy. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 3172-8. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>.
- [11] J. Sabin, M. Alatorre-Meda et al., New insights on the mechanism of polyethylenimine transfection and their implications on gene therapy and DNA vaccines, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 210 (2022) 112219. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112219>.
- [12] E. Tan, C. Chin et al., HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021) 796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>.
- [13] J. Berg, Y. Hung et al., A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio, *Nat. Methods* 6 (2009) 161-6. <https://doi.org/10.3389/10.1038/nmeth.1288>.
- [14] D. Jameson, N. James, J. Albanesi, Fluorescence fluctuation spectroscopy approaches to the study of receptors in live cells, *Fluor. Fluctuat. Spectrosc. (Ffs) Pt B* 519 (2013) 87-113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405539-1.00003-8>.
- [15] ATCC, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), 1X. <https://www.atcc.org/products/30-2213/>, 2023 (accessed 9 february 2024).
- [16] C. Hagemann, C. Meyer et al., High efficiency transfection of glioma cell lines and primary cells for overexpression and RNAi experiments, *J. Neurosci. Methods* 156 (2006) 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.03.003>.
- [17] S. Yamano and J. Moursi, Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents, *Mol. Biotechnol.* 46 (2010) 287-300. <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9302-5>.
- [18] T. Horibe, A. Akiyoshi et al., Transfection efficiency of normal and cancer cell lines and monitoring of promoter activity by single-cell bioluminescence imaging, *Luminescence* 29 (2014) 96-100. <https://doi.org/10.1002/bio.2508>.

[19] J. Zimmerman, A. Arnim, J. McLaughlin, *Cellular Respiration*, 4th ed., Mosby, New York, 2011 (Chapter 74). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07307-3.10074-6>.

[20] A. Meyrat and C. Ballmoos, ATP synthesis at physiological nucleotide concentrations, *Sci. Rep.* 9 (2019) 3070. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38564-0>.

Material Suplementar

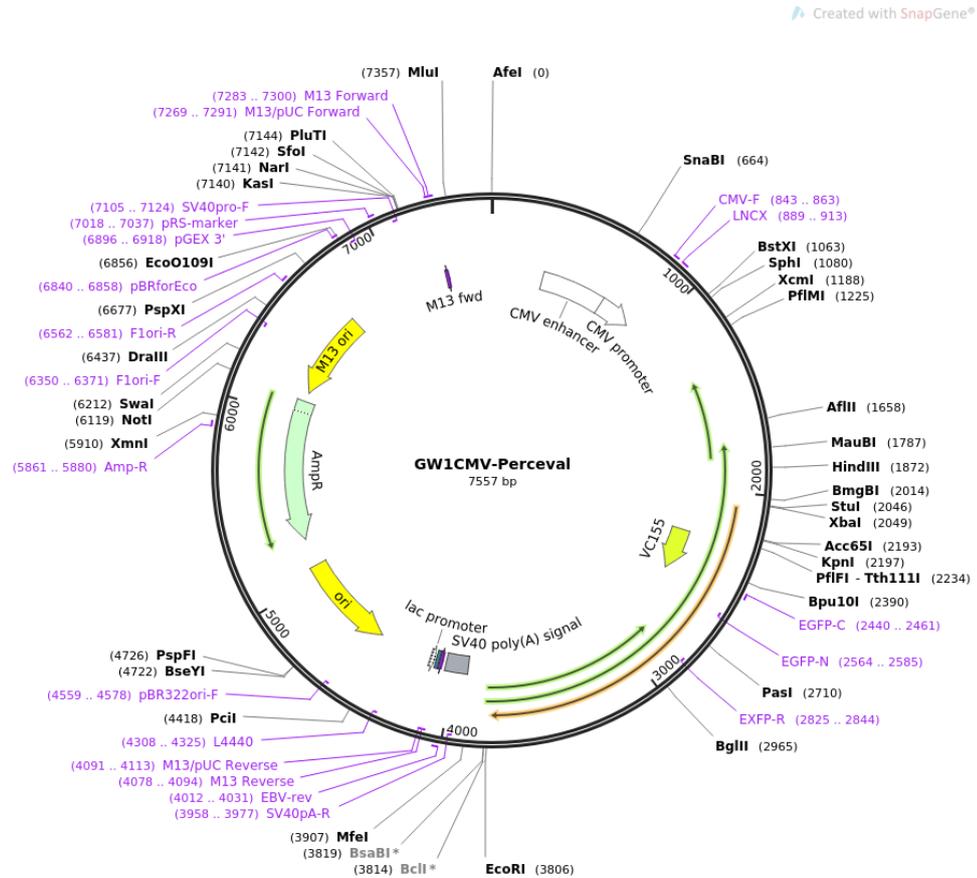
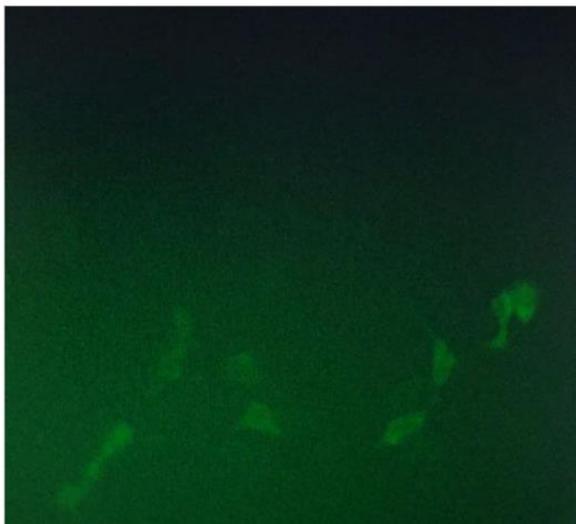


Figura S1. Sequência completa do plasmídeo GW1CMV-Perceval. Imagem ilustrativa que demonstra a região que codifica a resistência à ampicilina - antibiótico utilizado para selecionar as colônias bacterianas contendo o plasmídeo de interesse.

A Lipofectamina (*Lipofectamine Reagent*)



B PEI (polímero linear Polietilenimina)

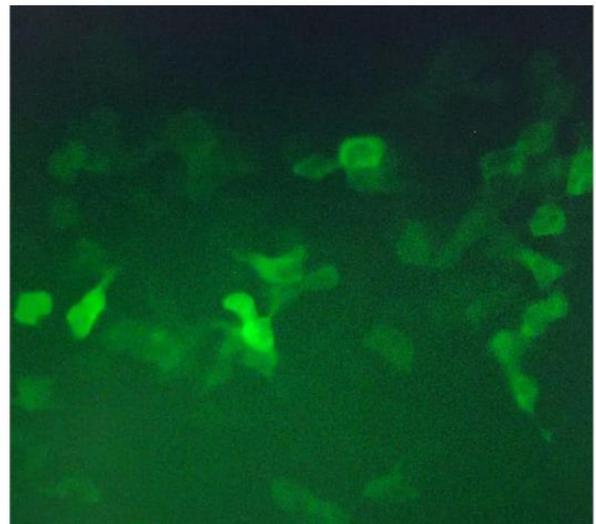


Fig S2. Transfecção utilizando diferentes reagentes. Imagens capturadas em microscópio de fluorescência EVOS Fluid três dias após transfecção de células da linhagem celular HEK-293T transfectadas com Perceval utilizando Lipofectamina (A) e PEI (B).

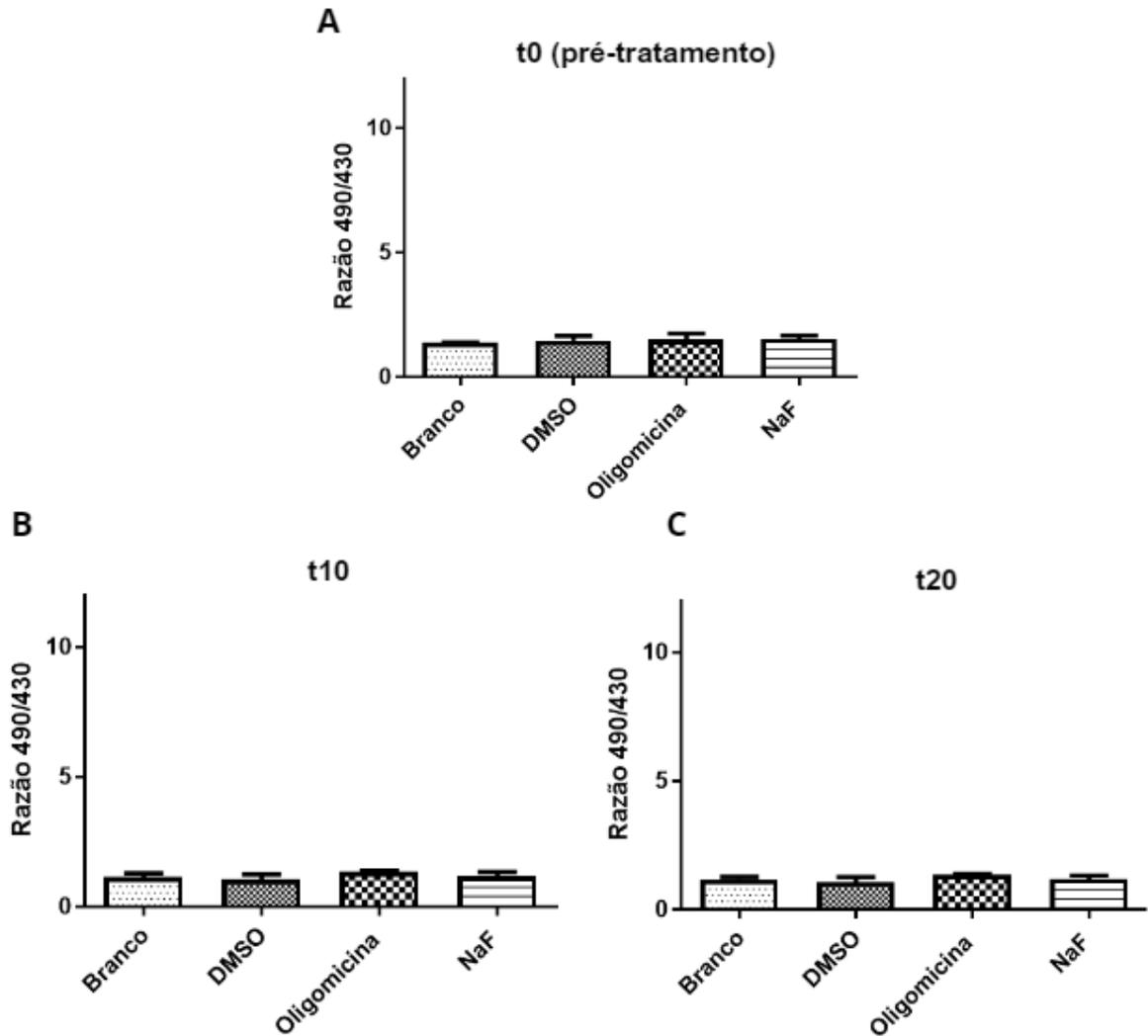


Fig. S3. Média das razões da intensidade de fluorescência. Leituras realizadas por fluorímetro em meio de cultivo em comprimentos de onda de excitação de 490 nm e 430 nm e de emissão de 520 nm pré e pós-tratamento com oligomicina (0,025 mM) e NaF (10 mM) em células HEK-293T transfectadas com Perceval. (A) Média das razões da intensidade de fluorescência no tempo 0 (pré-tratamento), tempo 10 (B) e tempo 20 (C). n=1, em triplicata.

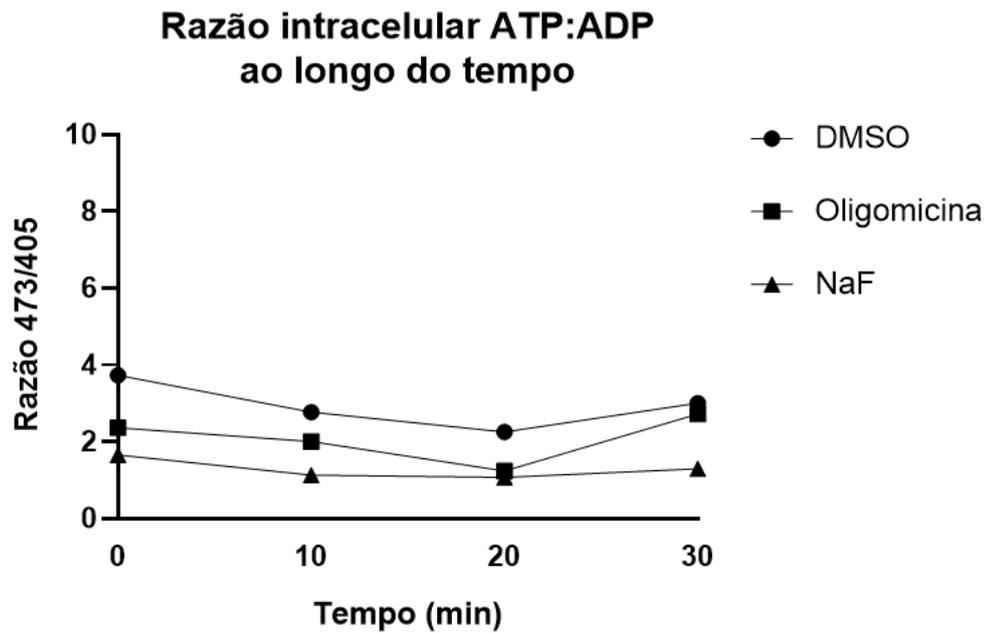


Fig. S4. Média das razões da intensidade de fluorescência ao longo do tempo. Variação nas médias das razões da intensidade de fluorescência ao longo do tempo no grupo controle (DMSO) e nos grupos que foram tratados com Oligomicina e NaF.

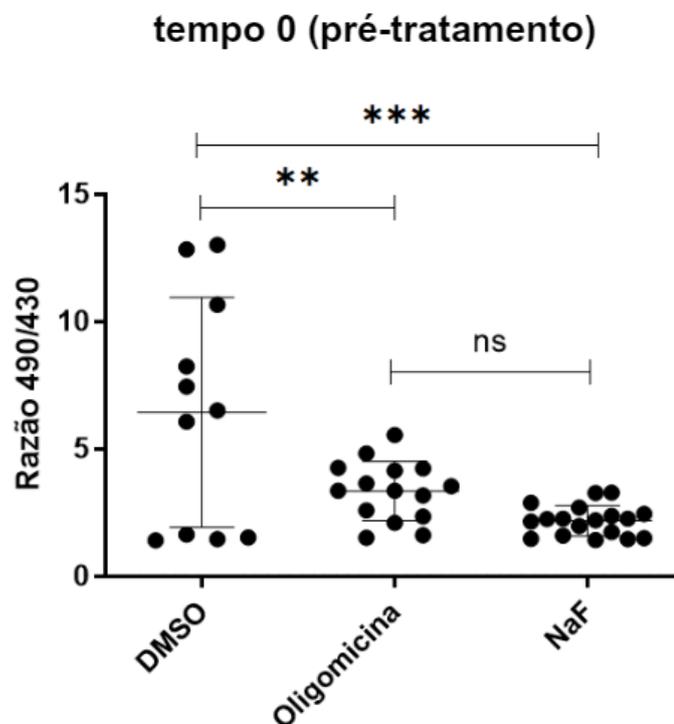


Fig. S5. Média das razões da intensidade de fluorescência. Leituras com excitação em 473 nm e 405 nm pré-tratamento (tempo 0) com oligomicina (0,025 mM) e NaF (10 mM) em células HEK-293T transfectadas com Perceval após aplicação do limiar para incluir somente células com morfologia de células viáveis. ANOVA e teste de Tukey foram aplicados. A diferença estatística foi considerada quando $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) ou $p < 0.0001$ (****). $n=2$.

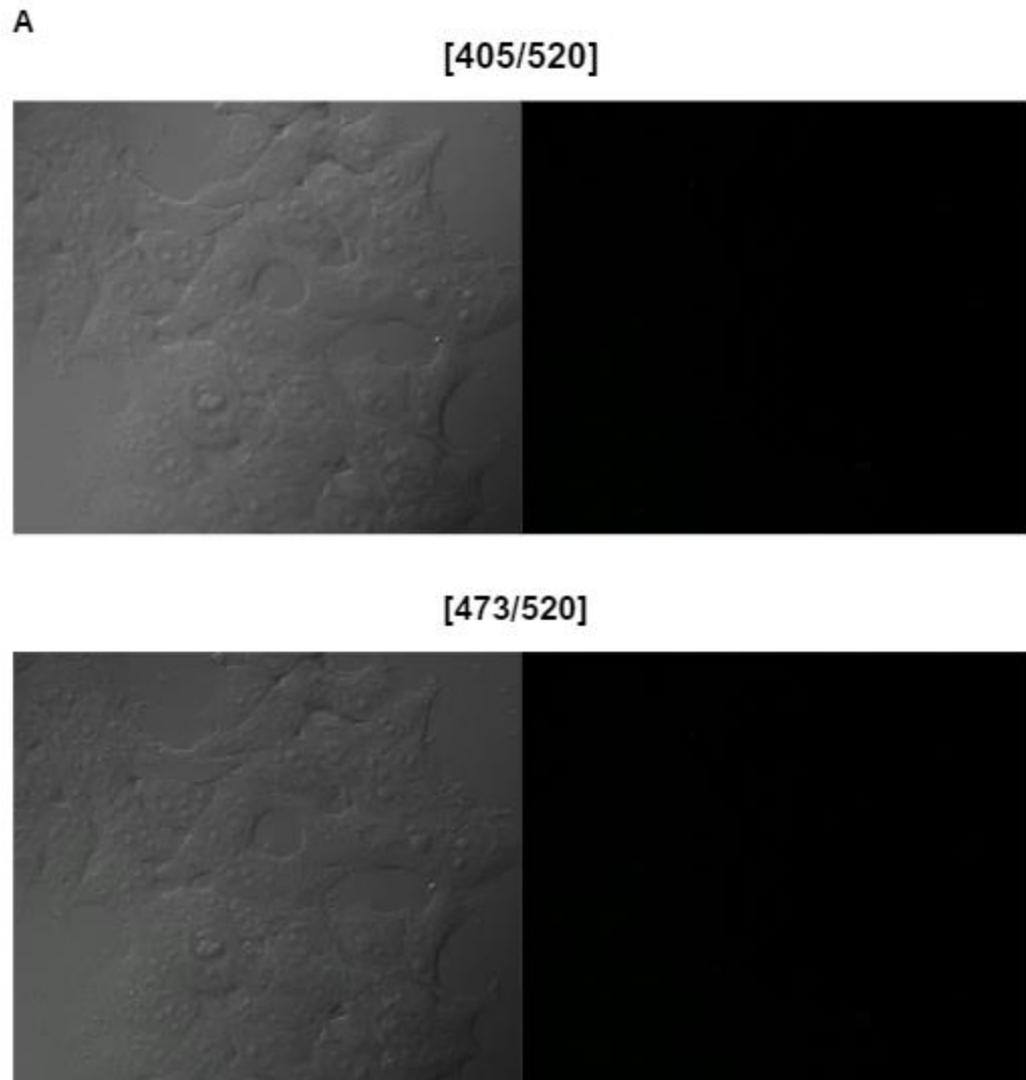


Figura S6. Análise da autofluorescência no microscópio confocal. Imagens obtidas no microscópio confocal do grupo branco (células não transfectadas com o sensor) com excitação em 405 e 473 nm e emissão em 520 nm.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A validação da funcionalidade de um repórter fluorescente de metabolismo em diferentes linhagens celulares, como o GW1CMV-Perceval, permite monitorar em tempo real e a nível de célula única a razão intracelular ATP:ADP, o que pode contribuir para solucionar questões ainda não esclarecidas sobre o metabolismo energético celular. Sendo assim, este estudo demonstrou a funcionalidade do biossensor em diferentes linhagens celulares. No entanto, a transfecção com o plasmídeo Perceval mostrou ser linhagem dependente - podendo apresentar dificuldade de transfecção em determinados tipos celulares - e, por isso, o objetivo descrito acima de avaliar o efeito da NTPDase5 na dinâmica da razão ATP:ADP não foi atingido. Os dados preliminares apresentados demonstram, também, que o fluorímetro tem potencial de ser aplicado - o que otimizará os tempos de análises, visto que é um equipamento comum em laboratórios de pesquisa. Contudo, o uso do microscópio confocal é importante, já que permite uma análise a nível de células individuais e, provavelmente, a melhor forma de avaliar o metabolismo energético utilizando o sensor é através da combinação de técnicas de análise de fluorescência, em fluorímetro e a microscopia confocal.

Como principais perspectivas deste trabalho, são recomendados ajustes de protocolo visando aumentar a eficiência de transfecção em células tumorais e, até mesmo, desenvolver um protocolo para produzir células com a expressão estável deste sensor. Posteriormente, também avaliar as alterações no metabolismo energético de células tumorais em resposta ao tratamento com quimioterápico, assim como é de suma importância investigar o efeito da NTPDase5 na heterogeneidade metabólica. Por fim, ainda são necessários mais estudos para compreender melhor sobre as limitações e adaptações que podem ser feitas durante o uso dos biossensores de metabolismo. A partir disso, o uso dos biossensores de metabolismo, como o Perceval, pode contribuir para esclarecer questões sobre o metabolismo e, com as adaptações necessárias, ajudar a compreender a heterogeneidade metabólica em células tumorais e seu impacto na resposta aos tratamentos usuais.

REFERÊNCIAS

- ARAI, Satoshi *et al*, RGB-color intensiometric indicators visualize spatiotemporal dynamics of ATP in single cells, **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 57, n. 34, p. 10873–10878, 2018.
- BERG, Jim; HUNG, Yin Pun; YELLEN, Gary, A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio, **Nature Methods**, v. 6, n. 2, p. 161–166, 2009.
- BONORA, Massimo *et al*, ATP synthesis and storage, **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 343–357, 2012.
- BOSE, Shree *et al*, Using genetically encoded fluorescent biosensors to interrogate ovarian cancer metabolism, **Journal of Ovarian Research**, v. 15, n. 1, p. 114, 2022.
- CEKIC, Caglar; LINDEN, Joel, Purinergic regulation of the immune system, **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 3, p. 177–192, 2016.
- CHAFFER, Christine L.; WEINBERG, Robert A., A Perspective on Cancer Cell Metastasis, **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 2011.
- COY, Shannon *et al*, Single cell spatial analysis reveals the topology of immunomodulatory purinergic signaling in glioblastoma, **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4814, 2022.
- DE CAMPOS, Rafael Paschoal; WINK, Marcia Rosângela; LENZ, Guido, ENTPD5: identification of splicing variants and their impact on cancer survival, **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 3, p. 467–480, 2021.
- DEBERARDINIS, Ralph J. *et al*, The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation, **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 2008.
- DZEJA, Petras; TERZIC, Andre, Adenylate Kinase and AMP Signaling Networks: Metabolic Monitoring, Signal Communication and Body Energy Sensing, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 4, p. 1729–1772, 2009.
- FANG, Min *et al*, The ER UDPase ENTPD5 promotes protein N-glycosylation, the Warburg effect, and proliferation in the PTEN pathway, **Cell**, v. 143, n. 5, p. 711–724, 2010.
- FLOOD, Darragh; LEE, Eun Sang; TAYLOR, Cormac T., Intracellular energy production and distribution in hypoxia, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 9, p. 105103, 2023.
- GREINER, Jack V.; GLONEK, Thomas, Intracellular ATP Concentration and Implication for Cellular Evolution, **Biology**, v. 10, n. 11, p. 1166, 2021.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation, **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HEATH, James R.; RIBAS, Antoni; MISCHÉL, Paul S., Single-cell analysis tools for drug discovery and development, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 3, p. 204–216, 2016.

HEERLEIN, Kristin *et al*, Hypoxia Decreases Cellular ATP Demand and Inhibits Mitochondrial Respiration of A549 Cells, **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 44–51, 2005.

HERZIG, Sébastien; SHAW, Reuben J., AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis, **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 121–135, 2018.

HUANG, Zhao; XIE, Na; ILLES, Peter; *et al*. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Cancer Topics. France, 2024. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/cancer-topics/>. Acesso em: 10 feb. 2024.

JACQUES-SILVA, Maria C *et al*, P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes, **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 7, p. 1106–1117, 2004.

JACQUES-SILVA, Maria C. *et al*, ERK, PKC and PI3K/Akt Pathways Mediate Extracellular ATP and Adenosine-Induced Proliferation of U138-MG Human Glioma Cell Line, **Oncology**, v. 67, n. 5–6, p. 450–459, 2005.

JOANITO, Ignasius *et al*, Single-cell and bulk transcriptome sequencing identifies two epithelial tumor cell states and refines the consensus molecular classification of colorectal cancer, **Nature Genetics**, v. 54, n. 7, p. 963–975, 2022.

KENNEDY, Helen J. *et al*, Glucose Generates Sub-plasma Membrane ATP Microdomains in Single Islet β -Cells: Potential Role For Strategically Located Mitochondria*, **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13281–13291, 1999.

LENZ, Guido *et al*, The Origins of Phenotypic Heterogeneity in Cancer, **Cancer Research**, v. 82, n. 1, p. 3–11, 2022.

LIBERTI, Maria V.; LOCASALE, Jason W., The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?, **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.

LOBAS, Mark A. *et al*, A genetically encoded single-wavelength sensor for imaging cytosolic and cell surface ATP, **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 711, 2019.

MARSIN, A.-S. *et al*, Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia, **Current Biology**, v. 10, n. 20, p. 1247–1255, 2000.

MORRONE, Fernanda B. *et al*, Extracellular Nucleotides and Nucleosides Induce Proliferation and Increase Nucleoside Transport in Human Glioma Cell Lines, **Journal of Neuro-Oncology**, v. 64, n. 3, p. 211–218, 2003.

MULERO, Julio J. *et al*, CD39-L4 Is a Secreted Human Apyrase, Specific for the Hydrolysis of Nucleoside Diphosphates *, **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20064–20067, 1999.

NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **What is Cancer?** United States, 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 19 dez. 2023.

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

OFORI, Jones K. *et al*, Elevated miR-130a/miR130b/miR-152 expression reduces intracellular ATP levels in the pancreatic beta cell, **Scientific Reports**, v. 7, p. 44986, 2017.

QIAN, Yanrong; WANG, Xuan; LIU, Yi; *et al*. Extracellular ATP is internalized by macropinocytosis and induces intracellular ATP increase and drug resistance in cancer cells. **Cancer Letters**, v. 351, n. 2, p. 242–251, 2014.

RECIO, Juan A. *et al*, Partial depletion of intracellular ATP mediates the stress-survival function of the PCPH oncoprotein, **Cancer Research**, v. 62, n. 9, p. 2690–2694, 2002.

SHIHAN, Mahbubul H. *et al*, A simple method for quantitating confocal fluorescent images, **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 25, p. 100916, 2021.

STAGG, J; SMYTH, M J, Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer, **Oncogene**, v. 29, n. 39, p. 5346–5358, 2010.

TAO, Rongkun *et al*, Genetically encoded fluorescent sensors reveal dynamic regulation of NADPH metabolism, **Nature Methods**, v. 14, n. 7, p. 720–728, 2017.

VANDER HEIDEN, Matthew G.; CANTLEY, Lewis C.; THOMPSON, Craig B., Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation, **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.

WARBURG, Otto; WIND, Franz; NEGELEIN, Erwin, THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY, **The Journal of General Physiology**, v. 8, n. 6, p. 519–530, 1927.

WHITE, Donnell; YANG, Qinglin, Genetically Encoded ATP Biosensors for Direct Monitoring of Cellular ATP Dynamics, **Cells**, v. 11, n. 12, p. 1920, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer>. Acesso em: 19 dez. 2023.

WU, Ning *et al*, AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1, **Molecular Cell**, v. 49, n. 6, p. 1167–1175, 2013.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA EXPERIMENTAL CELL RESEARCH

ARTICLE STRUCTURE

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 details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

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.

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

lower-case 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 example 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).

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.

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, it is recommended to include the following sentence:

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

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

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.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

Formats

Regardless of the application used, 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 the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- 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) in addition to color reproduction in print.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. 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.

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.

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.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

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 management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only

need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript.

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>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88), Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.