



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
CURSO DE FARMÁCIA

ENOCK LEE RODRIGUES BRAGA

KNOCKDOWN DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO N<sub>RF2</sub> EM CÉLULAS  
EMBRIONÁRIAS RENAIAS HUMANAS (HEK293T) PELO MÉTODO DE  
TRANSFEÇÃO COM PLASMÍDEO

FORTALEZA

2022

ENOCK LEE RODRIGUES BRAGA

KNOCKDOWN DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO Nrf2 EM CÉLULAS  
EMBRIONÁRIAS RENAIAS HUMANAS (HEK293T) PELO MÉTODO DE  
TRANSFEÇÃO COM PLASMÍDEO

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Disciplina de  
Monografia I do curso de Graduação  
em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Marco Antonio de  
Freitas Clementino

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B793k Braga, ENOCK LEE RODRIGUES BRAGA.

KNOCKDOWN DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO Nrf2 EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS  
RENAIS HUMANAS (HEK293T) PELO MÉTODO DE TRANSFEÇÃO COM PLASMÍDEO /  
ENOCK LEE RODRIGUES BRAGA Braga. – 2022.

44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará,  
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Marco Antonio de Freitas Clementino.

1. Cultura celular. 2. Transfecção. 3. Knockdown. 4. siRNA. 5. Nrf2. I. Título.

CDD 615

---

ENOCK LEE RODRIGUES BRAGA

KNOCKDOWN DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO N<sub>RF2</sub> EM CÉLULAS  
EMBRIONÁRIAS RENAIAS HUMANAS (HEK 293 T) PELO MÉTODO DE  
TRANSFEÇÃO COM PLASMÍDEO

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Disciplina de  
Monografia I do curso de  
Graduação em Ciências  
Farmacêuticas Universidade  
Federal do Ceará.

Aprovado em 25/12/2022

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Marco Antonio de Freitas Clementino (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Jeová, pelo presente da vida que me foi dada e todo o apoio em momentos de desgaste físico e emocional.

Aos meus queridos Pais, Enoc e Elenilda, pela criação e ensinamentos que me deram sobre a vida e as condutas a seguir dentro da sociedade.

Aos queridos professores, técnicos e monitores, estes que me presentearam com seu tempo e disponibilidade para esclarecimento de dúvidas sobre as mais variadas disciplinas.

As minhas queridas amigas Byanca e Gabi, por todo o apoio e carinho durante a graduação e principalmente após a virada da pandemia.

Aos meus queridos amigos JP e Felipe, pela ajuda e parceria durante os trabalhos das mais variadas disciplinas e ,claro, pelas risadas dentro e fora de sala.

Aos meus colegas que estão presentes aqui e para aqueles que não puderam ou já não estão aqui conosco.

Ao meu querido orientador Marco, pelos ensinamentos repassados e por essa metodologia de ensino participativa ao qual me permitiu fomentar e sedimentar conhecimentos.

Aos colegas de laboratório Samilly, Xhaulla, Marcus, Thiago, Dayara e Clarice pelos conhecimentos compartilhados e experimentos vividos durante toda minha pesquisa científica. Obrigado pelas risadas e reclamações, foram alicerces fundamentais para tudo.

A banca examinadora, pelas considerações e contribuições.

Sou imensamente grato por todos que fizeram parte da minha jornada, este é, enfim um dos momentos mais importantes da minha vida.

“O que você sabe não tem valor; o valor está no que  
você faz com o que sabe” (Bruce Lee)

## RESUMO

A cultura celular é uma importante ferramenta para o estudo de mecanismos moleculares envolvidos nos processos biológicos, permitindo a visualização da resposta a diferentes estímulos apresentando resultados de maneira rápida e efetiva em comparação com estudos *in vivo*. Por este motivo, houve o desenvolvimento de técnicas para elucidar tais mecanismos, como por exemplo a metodologia do RNA de interferência, estes fragmentos de RNA atuam por meio de alterações genômicas em alvos específicos através de formação de complexos enzimáticos como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), estes permitem alterações na expressão gênica celular e evidenciam a contribuição daquele fator celular dentro da cascatas de resposta molecular. A técnica com melhor custo benefício para silenciamento genético, é o *Knockdown*(KD), ou seja, a diminuição da expressão genética de um gene alvo, é através da transfecção por plasmídeo através de lipossoma à qual expressa com sucesso os pequenos fragmentos de RNA interferente (siRNA) na célula alvo. O presente estudo propôs uma metodologia de transfecção em cultura de células embrionárias tubulares renais HEK293T, utilizando o Escort™ IV Transfection Reagent, este se trata do lipossoma propriamente dito o qual apresenta-se com características catiônicas interagindo com moléculas eletronegativas como ácidos nucleicos, esta ligação auxilia para incorporação do plasmídeo pLV-CMV-SV40-Puro shNrf2, objetivando-se a criação de clones *knockdown* para Nrf2 - HEK293T Nrf2-KD competentes. Seguidamente, as células *knockdown* após estabilização passaram por processo de seleção celular com antibiótico puomicina, um amino nucleosídeo que tem como mecanismo de ação a interferência na transferência de peptídeos no ribossomo, as células transfectadas o qual tinha gene de resistência incluído ao plasmídeo resistem a concentrações gradativas de seleção atingindo a construção de uma população homogênea de clones HEK293T Nrf2-*knockdown*. Logo após, as células estabilizadas em concentração final de seleção foram coletadas para análise em RT-qPCR para evidenciação do sucesso da supressão da expressão gênica, evidenciando o silenciamento pela transfecção do siRNA. Os resultados apontam a diminuição de 50% da expressão de Nrf2 em comparação com o grupo controle, atestando o sucesso do silenciamento genético. Assim, pode-se afirmar que a metodologia proposta pelo presente trabalho cumpre o seu papel em atingir *knockdown* de Nrf2

em células HEK293T e se mostra como uma metodologia eficaz com baixo custo para processos de transfecção, sendo possível a adaptação da mesma para knockdown de outros genes através do desenho e inserção celular de outros plasmídeos com diferentes genes de interesse. Além disso abre margem para estudos futuros de compostos que utilizam esta via de sinalização molecular, como estudo de produtos fitoquímicos os quais possuem em literatura indicativos de ação por esta via molecular do Nrf2, tais estudos irão evidenciar o potencial terapêutico de novas substâncias e aumentar o escopo terapêutico para lesões provenientes de estresse oxidativo endógenos e exógenos.

**Palavras-chaves:** Cultura celular; Transfecção; Knockdown; siRNA; Nrf2

## ABSTRACT

Cell culture is an important tool for the study of molecular mechanisms involved in biological processes, allowing the visualization of the response to different stimuli presenting results quickly and effectively compared to in vivo studies. For this reason, techniques have been developed to elucidate such mechanisms, such as the interference RNA methodology. These RNA fragments act by means of genomic alterations in specific targets through the formation of enzymatic complexes such as RNA-induced silencing complex (RISC), which allow alterations in cellular gene expression and show the contribution of that cellular factor within the molecular response cascades. The most cost-effective technique for gene silencing, is Knockdown(KD), i.e., the decrease of gene expression of a target gene, is through plasmid transfection via liposome to which successfully expresses the small interfering RNA fragments (siRNA) in the target cell. The present study proposed a transfection methodology in culture of HEK293T embryonic renal tubular cells, using the Escort™ IV Transfection Reagent, which is the liposome itself, with cationic characteristics, interacting with electronegative molecules such as nucleic acids, This binding helps to incorporate the plasmid pLV-CMV-SV40-Puro shNrf2, aiming to create Nrf2 knockdown clones - HEK293T Nrf2-KD competent. After stabilization, the knockdown cells underwent a cellular selection process with puromycin antibiotic, an amino nucleoside whose mechanism of action is to interfere in the transfer of peptides in the ribosome. The transfected cells, which had a resistance gene included in the plasmid, resisted gradual concentrations of selection, reaching the construction of a homogeneous population of HEK293T Nrf2-knockdown clones. Soon after, the stabilized cells in final selection concentration were collected for analysis in RT-qPCR for evidencing the success of gene expression suppression, evidencing the silencing by siRNA transfection. The results show a 50% decrease in Nrf2 expression compared to the control group, attesting to the success of gene silencing. Thus, it can be said that the methodology proposed by this work fulfills its role in achieving Nrf2 knockdown in HEK293T cells and shows itself as an effective methodology with low cost for transfection processes, being possible to adapt it for knockdown of other genes through the design and cellular insertion of other plasmids with different genes of interest. Moreover, it opens the margin for future studies of compounds that use this pathway of molecular signaling, such as the study of

phytochemical products that have in the literature indications of action by this molecular pathway of Nrf2, such studies will highlight the therapeutic potential of new substances and increase the therapeutic scope for injuries from oxidative stress endogenous and exogenous.

**Keywords:** Cell Culture; Transfection; Knockdown; siRNA; Nrf2

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Figura representativa do PLV-CMV-SV40-Puro.....	18
Figura 2 –	Ciclo do cultivo celular para a linha experimental.....	20
Figura 3 –	Incorporação dos plasmídeos para replicação em DH5 $\alpha$ .....	22
Figura 4 –	Protocolo de purificação do Plasmídeo.....	24
Figura 5 –	Protocolo de transfecção.....	26
Figura 6 –	Seleção de clones HEK293T Nrf2.....	27
Figura 7 –	Protocolo extração de RNA.....	29
Figura 8 –	Protocolo cDNA.....	30
Figura 9 –	Protocolo RT-qPCR com enzima da Promega.....	32
Figura 10 –	Diminuição expressão gênica de Nrf2 em células <i>knockdown</i> .....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> RT-qPCR.....	31
Tabela 2 – Composição da reação, <i>MasterMix</i> .....	31

## ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO	RNAse H tipo argonauta
ARE	elemento de resposta antioxidante
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FBS	Soro bovino fetal
GSH	Glutathione
HO-1	Hemeoxigenase-1
HEK293	Células do rim embrionário Humano 293T
KD	Knockdown
KEAP1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
miRNA	MicroRNA
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NQO1	Quinona oxidoreductase
Nrf2	Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2
PBS	Salina fosfato básica
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
shCTRL	Células silenciadas controle
siRNA	Pequeno RNA interferente
shNrf2	Células silenciadas para Nrf2
UGT1A6	UDP-glucuronil-transferase 1A6

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Cultura de células</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Transfecção</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Transfecção por plasmídeo</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Knockdown</b>	<b>15</b>
<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Delineamento e local da pesquisa</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Obtenção de células e plasmídeo</b>	<b>18</b>
<b>3.4 Técnicas utilizadas</b>	<b>19</b>
3.4.1 Cultivo de células	19
3.4.2 Crescimento e isolamento dos plasmídeos em bactérias	20
3.4.3 Protocolo de purificação dos plasmídeos	22
3.4.4 Transfecção por plasmídeo	24
3.4.5 Acompanhamento da estabilidade e Seleção das células NF2/KO	26
3.4.6 Análise da Reação da cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)	27
3.4.7 Extração do RNA total	27
3.4.8 Síntese de cDNA	29
3.4.9 RT-qPCR	30
3.4.10 Análise Estatística	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O método de transfecção é um ensaio com genes recombinantes em cultura de células *in vitro*. Esses ensaios conquistaram espaço na avaliação de riscos à saúde e na avaliação de mecanismos de ação. Sua implementação como tiragem de alto rendimento, contribuiu para cobrir a alta demanda de estudos investigando mecanismos moleculares de produtos químicos manufaturados. Esta metodologia permite a visualização a um nível mais profundo do modo de ação tóxica de um produto em comparação com um modelo *in vivo*. Devido a inexistência das reações de biotransformação em teste *in vitro* algumas respostas provenientes da exposição podem ser subestimadas, entretanto os resultados obtidos são de suma importância para elucidação dos mecanismos celulares envolvidos, assim como predispor possíveis resposta no organismo (FISCHER *et al.*, 2020).

O fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide (Nrf2), é um fator de transcrição mestre responsável pela proteção contra inflamação e estresses oxidativos. Diante de tais estímulos o Nrf2 se transloca para o núcleo, onde interage com elementos da resposta antioxidante, sendo eles: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH), quinona oxidoreductase (NQO1), hemeoxigenase-1 (HO-1), entre outros. Há ainda evidências de que a via do Nrf2 está relacionada de maneira estreita com a regulação inflamatória. A indução concomitante desta via e inibição da inflamação por outros mecanismos celulares é considerada um mecanismo pelo qual os fitoquímicos exibem seus efeitos protetores perante a estresses oxidativos (KHOR; YU; KONG, 2008).

Diante do exposto, é de suma importância a existência de um modelo de células cuja expressão Nrf2 está inibida. Este *knockdown*(KD) direcionado ao Nrf2 irá produzir um grupo de células que não estejam aptas a utilizar os mecanismos de proteção antioxidante provenientes desta via. Este modelo permitirá a realização de futuros estudos frente agentes nefroprotetores quanto a sua capacidade antioxidante sem a interferência de Nrf2 ou a elucidação da via de sinalização ao qual ele age. Deste modo o objetivo deste trabalho é desenvolver um modelo de KD para Nrf2 em células embrionárias renais humanas (HEK293T).

## 1.1 Cultura de células

A cultura de tecidos tem seu início datado há mais de 100 anos. Ross Harrison resolveu cultivar o tecido de embrião de rãs em coágulos de plasma, objetivando observar a presença de fibras nervosas ativas e em desenvolvimento obtendo sucesso em seu experimento. Posteriormente com os avanços de pesquisas voltadas ao crescimento de células, determinou-se que células poderiam ser alteradas geneticamente objetivando-se a criação de linhagens celulares distintas, as quais apresentariam características semelhantes à sua célula de origem. Logo, deu-se origem ao desenvolvimento de diversos meios nutricionais para os variados tipos de células, representativas de diversos tecidos (MATHER; ROBERTS, 1998).

A cultura de células tornou-se uma ferramenta importante para estudar problemas de relevância clínica, visto que fornece acesso direto à avaliação de tecidos e seus mecanismos de toxicidade celular. Os benefícios da cultura celular englobam a facilitação no estudo e compreensão de mecanismos moleculares, os quais são vitais para o desenvolvimento de novos alvos celulares para clínica, tal como avaliação de novos agentes terapêuticos sobre diferentes células e tecidos (ALLEN *et al.*, 2005).

As células do Rim Embrionário Humano 293 (HEK293) são derivadas de uma confecção de uma linhagem celular experimental bem-sucedida, sendo elas dotadas de um amplo histórico de aplicações diversas em cultura de célula como produção de insumos farmacêuticos, análises de formação de tecido e estudos em biologia celular (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015).

Portanto, as HEK293 são utilizadas com frequência para expressão de proteínas recombinantes transitórias, seu uso é associado à alta eficiência de transfecção, escalabilidade de trabalho e padrão de glicosilação humana bem definido (DEKEVIC *et al.*, 2022).

## 1.2 Transfecção

A palavra transfecção tem origem de “transformação por infecção”, isto significa, alterar propriedades celulares pela introdução de novos genes. Esta

metodologia visa aumento da expressão de genes e/ou proteínas pela introdução de sequências de DNA recombinante ou supressão da expressão de genes e/ou proteínas de maneira total ou parcial pela introdução de RNA de interferência (SALOZHIN; BOL'SHAKOV, 2010).

A transfecção é uma técnica que visa a inserção de um segmento de ácido nucléico externo em células com o intuito de gerar células geneticamente modificadas. Tal artifício permite o estudo da função e regulação de genes e funções proteicas. Existem dois tipos de transfecção, sendo elas: a estável, onde os genes são integrados ao genoma da célula e perpetuados em novas divisões celulares; e transitória, em que os genes são expressos por um período, perdendo-se estas características nas futuras linhagens celulares, já que os genes não são introduzidos ao genoma celular. Assim como tipos, existem diferentes metodologias para realizar uma transfecção, podendo ser eles métodos biológicos (DNA), químicos e físicos (KIM, EBERWINE, 2010).

A lipofecção convencional é fundamentada em moléculas lipídicas de caráter catiônico, geralmente associados a lipídios neutros que viabilizam associação à membrana. Estas, originam lipossomas que interagem com ácidos nucleicos de caráter eletronegativo(plasmídeos). Estes reagentes transferem pequenos RNAs interferentes(siRNAs) e MicroRNAs (miRNA) de maneira efetiva em linhas experimentais com células. Além disso, em geral tratam-se de técnicas simples não requerendo equipamentos de alta especialização, são reprodutíveis, com aperfeiçoamento de baixo grau e não tóxicos (KARRA ; DAHM, 2010).

Na atualidade, as tecnologias baseadas em edição genética têm dominado o cenário do estudo da função de genes em doenças, estes sendo essenciais para elucidação do mecanismo molecular desencadeador das alterações no organismo (JIA et al, 2022).

### **1.3 Transfecção por plasmídeo**

Os plasmídeos são moléculas de DNA que se replicam de maneira autônoma em bactérias. Eles são conhecidos como elementos genéticos móveis, podendo ser transferidos entre diferentes organismos. Esse componente celular tem sido utilizado

como ferramenta de manipulação genética para a expressão de DNA exógeno. O delineamento de um plasmídeo baseia-se em constitucionalmente no conteúdo gênico do plasmídeo o qual representa o gene de interesse para transfecção; assim como marcadores para manutenção e estabilidade do plasmídeo; Interação com o anfitrião, ou seja, as regiões de seletividade de interação do plasmídeo com célula alvo e as restrições no genoma que são os fatores benéficos para estabilização plasmídeo-hospedeiro. Isto posto, para aplicação de uma transfecção por plasmídeo, deve-se delimitar bem o gene a ser investigado, e o desenho de um plasmídeo que permita o estudo do mesmo (YANO, 2019).

#### **1.4 Knockdown**

A capacidade de reduzir precisamente a expressão de um gene ou seu produto dentre os milhares presentes no organismo e transmitir tal alteração para as linhagens subsequentes, faz parte da rotina de criação de modelos *in vivo* e *in vitro* para o estudo da fisiopatologia e terapia de doenças em humanos. As técnicas de transfecção permitem que a biologia molecular seja integrada à fisiologia do animal em sua totalidade como organismo, promovendo a compreensão da regulação molecular da fisiologia e comportamentos complexos de sinalização celular (MAJZOUB, MUGLIA, 1996)

Atualmente o modelo de *knockdown* é dominado pela tecnologia dos RNA de interferência (RNAi), onde desempenham papel de ferramenta robusta para genômica funcional e compreensão da sistemática da biologia. Esta técnica é utilizada geralmente através da inserção de vetores plasmídeos promovendo KD de longo prazo. Ademais, a avaliação do KD pode ser realizada por RT-qPCR (SHAN, 2010).

O RNAi foi descrito pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* uma espécie de nematódeo da família *Rhabditidae* e se configurou como ferramenta molecular de RNA a qual desencadeia a degradação de mRNAs semelhantes (MCNAMARA *et al*, 2006). Neste sentido, o KD da expressão gênica em cultura de células é amplamente utilizado para evidenciar as implicações decorrentes da perda de função em genes individuais por mutação (HAN, 2018).

Uma classe de pequenos RNAs interferentes (shRNAs) clivam de maneira seletiva RNA mensageiros (mRNA) alvos, induzindo shRNA. Estes são clivados em pedaços nucleotídeos 22nt, seguidamente são incorporados pela endonuclease RNaseH-like Argonaute (AGO) a qual origina o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Posteriormente o complexo identifica e cliva o mRNA alvo impedindo sua tradução, conseqüentemente silenciando a expressão genética (KANASTY et al, 2013; SHINOHARA et al, 2021).

### 1.5 O gene Nrf2

O fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (Nrf2) é um regulador fundamental no equilíbrio dos mecanismos redox celulares. Em condições normais, o Nrf2 se localiza citoplasma e sofre estabilização pela proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (KEAP1) e prontamente deteriorada por proteossomas. Diante de um processo de estresse oxidativo, o Nrf2 é liberado de KEAP1, transfere-se para o núcleo e forma heterodímeros constituídos de pequenas proteínas de fibrossarcoma músculo aponeurótico, os quais se ligam ao elemento de resposta antioxidante (ARE) em diversos promotores genéticos, incluindo genes antioxidantes e desintoxicantes (ZHAO *et al*, 2018).

Estudos atuais indicam que o Nrf2 é um mediador em atividades citoprotetoras celulares antiinflamatórias, desintoxicantes, antioxidantes e autofágicas. Estudos com Nrf2 indicam avanços no retardamento do envelhecimento, melhoria da saúde, e combate a doenças crônico-degenerativas, já que o mesmo é importante regulador na homeostase corporal (CALABRESE ; KOZUMBO, 2021). O Nrf2 está atualmente ligado a regulação do ARE e suas enzimas antioxidantes, transcrição genes desintoxicantes como UDP-glucuronil-transferase 1A6, HO-1 e manganês superóxido dismutase (MnSOD), auxilia na manutenção de Glutathiona (GSH), regula o ferro na hemólise tecidual, regulação de proteossoma diminuindo ROS, além de estar envolvido no equilíbrio energético mitocondrial e apoptótico (BARDALLO *et al*, 2021)

## **1. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral:**

Desenvolver células renais HEK293T geneticamente modificadas expressando shRNA cujo alvo é o gene do Nrf2 pelo método de transfecção com plasmídeo.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Amplificação e purificação de plasmídeos
- Realização da técnica de transfecção em células HEK293-T;
- Seleção das células transfectadas
- Validação knockdown pela avaliação de alterações da expressão gênica

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

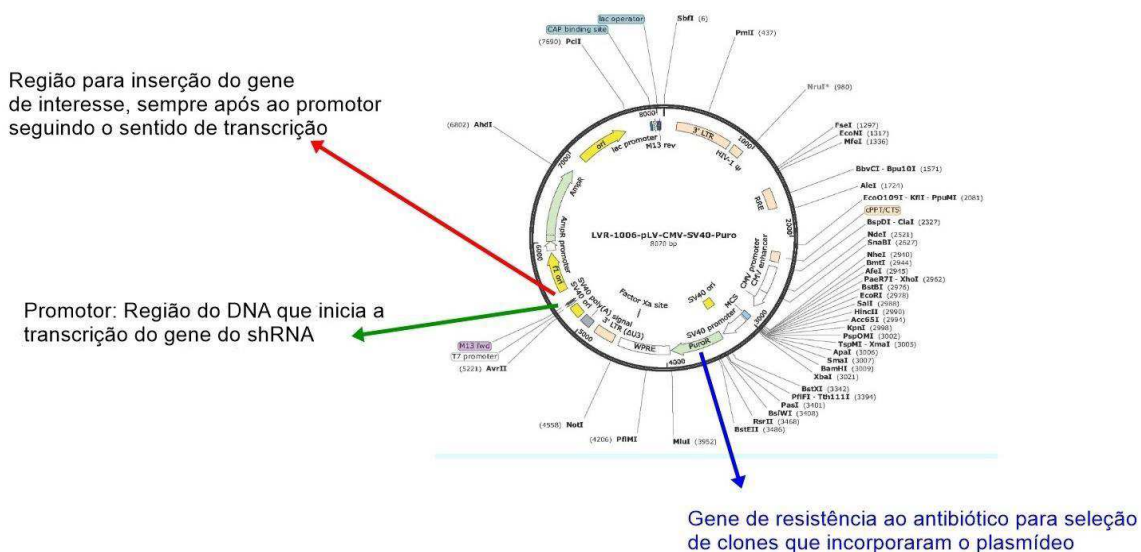
#### 3.2 Delineamento e local da pesquisa

O presente estudo trata-se de um experimento *in vitro* por meio de cultura de células, pela técnica de supressão gênica chamada *knockdown* realizado no Núcleo de Biomedicina (NUBIMED) localizado na Universidade Federal do Ceará (UFC)

#### 3.3 Obtenção de células e plasmídeo

Células HEK 293T(ATCC12022001) foram obtidas do BioBanco do Núcleo de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Plasmídeo do shNrf2 como visto na (FIGURA 1) e o shCtrl foram clonados no plasmídeo pLV-CMV-SV40-Puro com o gene repórter da luciferase inserido no site da XhoI, pelos pesquisadores do 'DREAM Lab' da Universidade de São Paulo e doados ao laboratório (ROCHA *et al.*, 2016).

**Figura 1:** Figura representativa do pLV-CMV-SV40-Puro



Fonte: Adaptado de T&J Biomedical

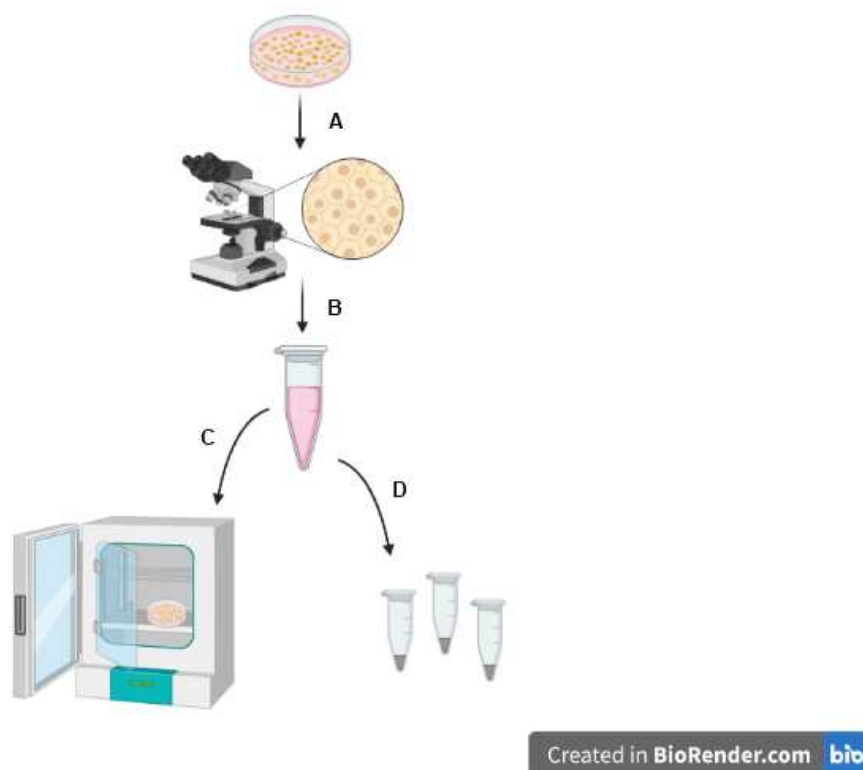
### **3.4 Técnicas utilizadas**

#### **3.4.1 Cultivo de células**

O Cultivo de células foi feito em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,2) o qual foi suplementado com soro fetal bovino 10% (Fetal Serum Bovine - FBS) e 1% de penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L). Para o cultivo das HEK293T foram fornecidas as condições ideais para sua proliferação celular sendo elas: 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O acompanhamento da aderência, crescimento e confluência em monocamada foram realizadas em placas de petri de vidro reutilizadas, as quais passavam por protocolo de esterilização dupla em autoclave. um após o repique de células e a outra para limpeza efetiva e com individualização em papel grau cirúrgico. A visualização das células foi realizada em microscópio de inversão como visto na (FIGURA 2) ao qual obedecia a protocolo de limpeza e desinfecção após visualização das placas. A confluência adotada para os experimentos foi acima de 70%.

A manutenção das células foi realizada sempre que atingida a confluência de 85% da placa, onde era realizado a lavagem e remoção das células através do tampão fosfato (PBS), utilizando 2 mL do mesmo e recolhendo para um microtubo plástico (McP) para centrifugação a 6000 rpm por 1 minuto, obtendo-se pellet de células. Este era ressuspenso em 1 mL de meio de cultura e seguia para contagem de células com 10 µL desta suspensão em câmara de Neubauer no campo de leucócitos. Posteriormente, obtendo-se a concentração da população celular estes eram recolhidos para experimento em centrifugação para coleta do pellet limpo e seco, repicados para novas placas para linha experimental ou criopreservados com adição de Dimetilsulfóxido(DMSO) a 10%.

**Figura 2:** Ciclo do cultivo celular para a linha experimental.



Fonte: Autor, via Biorender. **A** - Visualização do estado de confluência celular. **B** - Coleta de células da placa. **C** - Repique das células para manutenção e crescimento da população definida para experimentos. **D** - Coleta de *pellets* para extração de RNA para experimentos

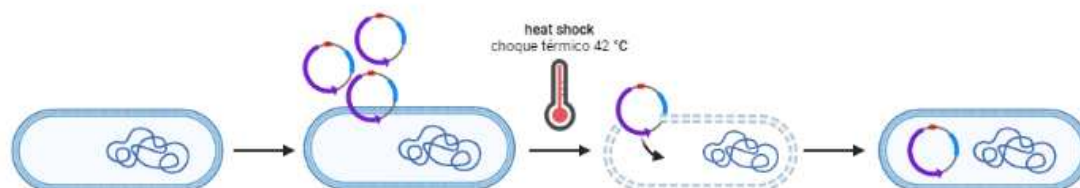
### 3.4.2 Crescimento e isolamento dos plasmídeos em bactérias

As células DH5 $\alpha$  são uma cepa de *Escherichia coli* versátil com eficiência para subclonagem, fornecem uma transformação com efetividade  $> 1 \times 10^6$  UFC/ $\mu$ g de DNA plasmídico, trata-se de um procedimento econômica para subclonagem de rotina e fornecem marcadores genéticos úteis para aplicações gerais(Thermo Fisher Scientific, EUA).

Primariamente foi realizado o descongelamento das bactérias e distribuídas em alíquotas de 50  $\mu$ L, nestas foram adicionadas 0,1  $\mu$ g de plasmídeo, logo após foram incubados em gelo por 30 minutos, posteriormente expostos ao banho maria

42°C por 30 segundos, e novamente retornou ao gelo por 2 minutos, este processo é conhecido como heat shock, que consiste basicamente em alterações de temperatura visando alterações na parede celular bacteriana possibilitando a entrada do plasmídeo, como visto na (FIGURA 3). Sem demora, foi adicionado 500 µL de meio LB broth (sem antibiótico) e levados à incubadora em 37°C por 45 minutos, logo depois espalhou-se em placas aquecidas para cultivo em meio LB broth (meio para crescimento bacteriano), a concentração final teve 50µg/ml de ampicilina. Após isso, foi realizado repique das colônias em tubo Falcon em 5 mL de meio contendo Canamicina para seleção de bactérias com plasmídeo, e foi levado a incubadora durante a noite à 37 °C em agitador à 200 rpm. Finalmente, *E.coli* *dH5alpha* contendo o plasmídeo cresceram neste meio por 18 à 24 horas. O crescimento foi realizado em triplicata sendo necessário 5 ml de meio para cada repetição. Após a incubação, vials de cada tubo foram congelados, ou seja, foram adicionados 100µl de glicerol a 900µl de meio com bactéria e armazenados a -80 C. Essas bactérias foram adicionadas ao BioBanco do Núcleo de Biomedicina da UFC para fazerem parte do estoque de bactérias que expressam o plasmídeo.

**Figura 3:** Incorporação dos plasmídeos para replicação em DH5α.



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

Fonte: Autor, via Biorender. A técnica de choque térmico consiste no aumento repentino de temperatura, este induz a formação de poros na membrana plasmática da bactéria e favorecendo a entrada do plasmídeo para o meio intracelular.

### 3.4.3 Protocolo de purificação dos plasmídeos

Todas as etapas de purificação devem ser realizadas em temperatura ambiente todas as centrifugações em uma microcentrífuga de mesa a 12.000 x g (10.000 - 14.000 rpm, dependendo do tipo de rotor). Utilizamos de 1 a 5 ml de cultura de *E. coli* em meio LB para purificação de plasmídeos de alta cópia, para plasmídeo de baixa cópia, use até 10ml de cultura.

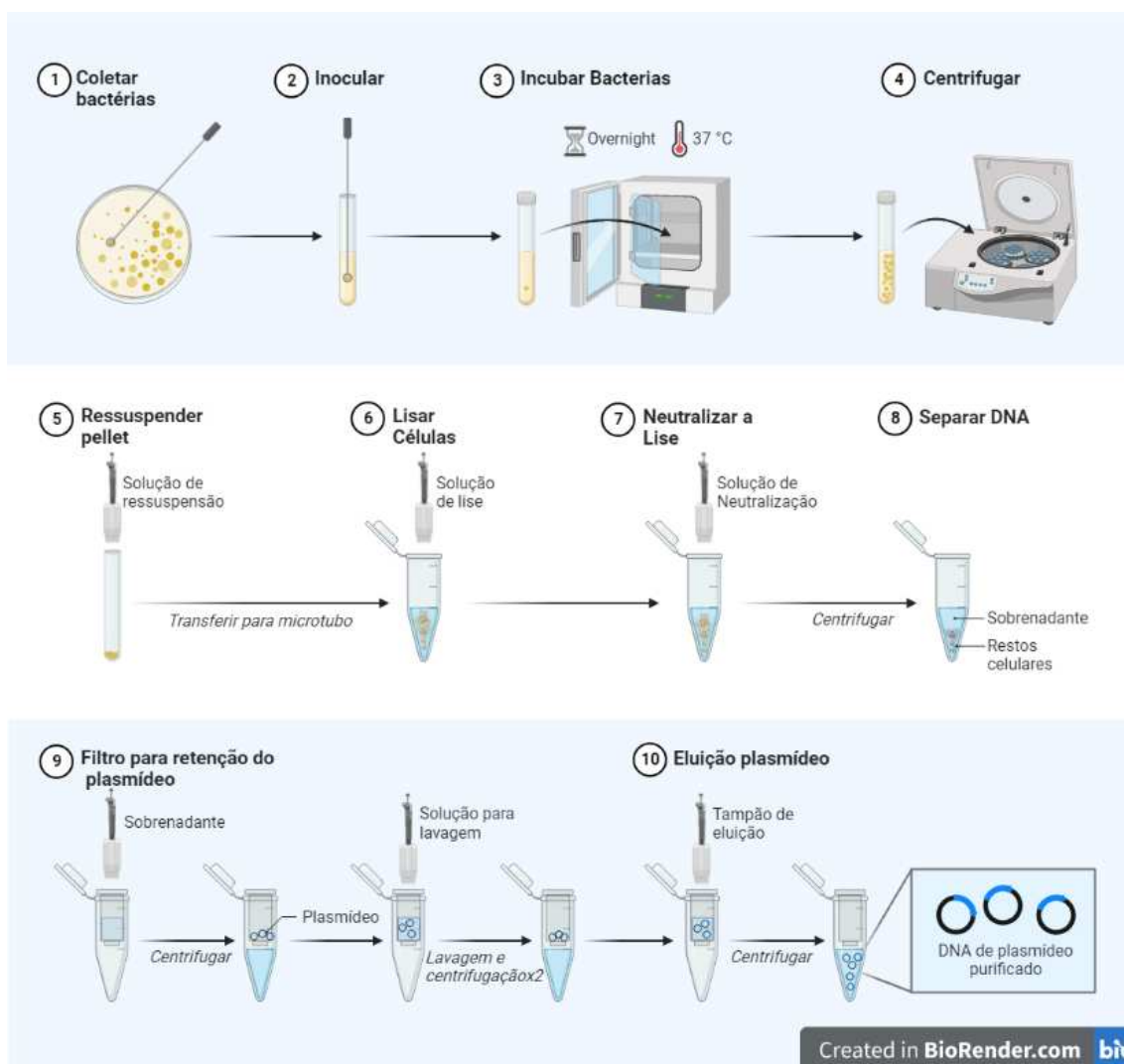
As células peletizadas foram ressuspensas em 250  $\mu$ l da solução de ressuspensão, e esta foi transferida para um tubo de microcentrífuga objetivando ressuspensão completa por vórtice ou pipetagem para cima e para baixo até que nenhum aglomerado de células permaneça. Logo após, foi adicionado 250  $\mu$ l da solução de lise e o tubo foi invertido 4-6 vezes até que a solução apresentasse aspecto viscoso e ligeiramente límpida, não foi agitado em vórtice para evitar o

encolhimento do DNA cromossômico e não foi incubado por mais de 5 minutos para evitar a desnaturação do DNA de plasmídeo. Seguidamente, foi adicionado 350 µl da solução de neutralização e repetiu-se o processo de homogeneização, porém com suavidade de maneira a evitar precipitação localizada de restos celulares bacterianos. Centrifugou-se por 5 min para sedimentar restos de células e DNA cromossômico.

Sem demora, foi transferido o sobrenadante para a coluna de centrifugação GeneJET fornecida por decantação ou pipetagem. Em seguida, passou por nova centrifugação por 1 min. Descartou-se o fluxo a coluna foi colocada de volta no mesmo tubo de coleta e com posterior lavagem com 500 µl de solução Wash 1 (# R1611, diluída com isopropanol) e centrifugou-se por 30-60 segundos. Prontamente o fluxo foi descartado. Processo repetido 3 vezes, para obter material livre de impurezas. Posteriormente, descarte o fluxo direto e centrifugue por mais 1 minuto para remover a solução de lavagem residual, esta etapa é essencial para evitar etanol residual em preparações de plasmídeo.

Por fim, foi transferida a coluna de rotação GeneJET para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml novo e foi adicionado 50 µl do tampão de eluição ao centro da membrana da coluna de rotação GeneJET para eluir o DNA de plasmídeo. A seguir foi incubado por 2 min em temperatura ambiente e centrifugado por 2 min. Logo após, descarte a coluna e armazene o DNA de plasmídeo purificado a -20°C. Abaixo pode ser ver um esquema reduzido do fluxo de processo na (FIGURA 4)

**Figura 4:** Protocolo de purificação do Plasmídeo



Fonte: Autor, adaptado Biorender

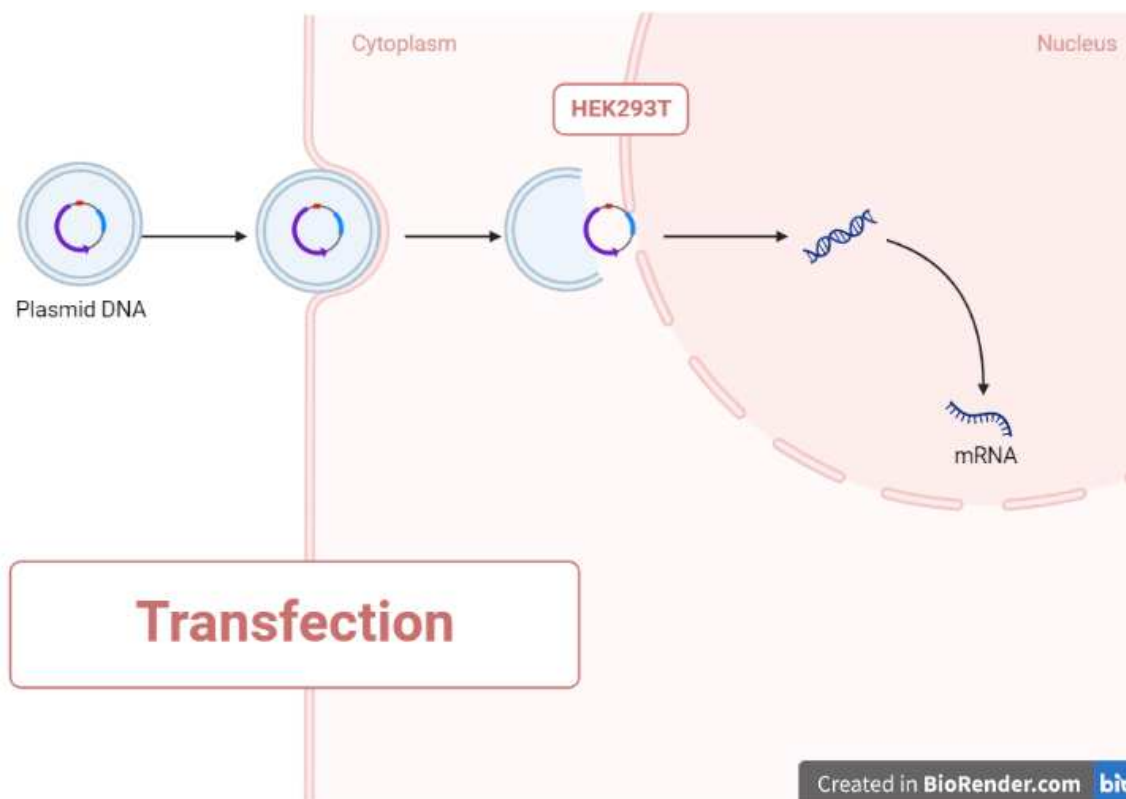
### 3.4.4 Transfecção por plasmídeo

Procedeu-se com a preparação da solução 1 para ambos os plasmídeos com diluição de 2 µg de plasmídeo em 500 µL de meio sem FBS e sem antibiótico. Para o plasmídeo 1 (shNrf2) foi adicionado 22 µL de plasmídeo + 478 µL de meio já para a Luciferase adicionou-se 7 µL de plasmídeo + 493 µL de meio. Também se faz necessário preparação da solução 2, para isso foi diluído 20 µL de Escort™ IV Transfection Reagent em 500 µL de meio sem FBS e antibiótico. Em seguida, foi

misturado soluções 1 e 2 por agitação suave do tubo com posterior incubação da mistura para descansar em temperatura ambiente por 30 min. Durante a espera, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (pH 7,0) em meio sem FBS e sem antibiótico.

Para preparar o repique das células, foram adicionados 8 mL de meio sem FBS e sem antibiótico as placas e adicionado 1000  $\mu$ L de lipossomo + plasmídeo aos 8mL de meio. Esta mistura de Lipossomas + Plasmídeo foi adicionada na placa em forma de gota ao redor da placa, depois realizou-se a incubação por 6-8h na estufa, este é o processo de transfecção propriamente dito ilustrado na (FIGURA 5). Posteriormente fez-se troca do meio e por um novo meio completo com 10% FBS e 1% antibiótico, as células foram deixadas em recuperação por 48h, com a realização de repiques com a adição de pequenas concentrações de puromicina para começar a selecionar as células que assimilaram o plasmídeo. O primeiro teste de transfecção foi realizado 72h após o início da seleção, mantendo a seleção com concentrações crescentes de puromicina por um mês de cultura contínua. Após um mês, separe clones para congelar células que estão transfectadas de maneira estável.

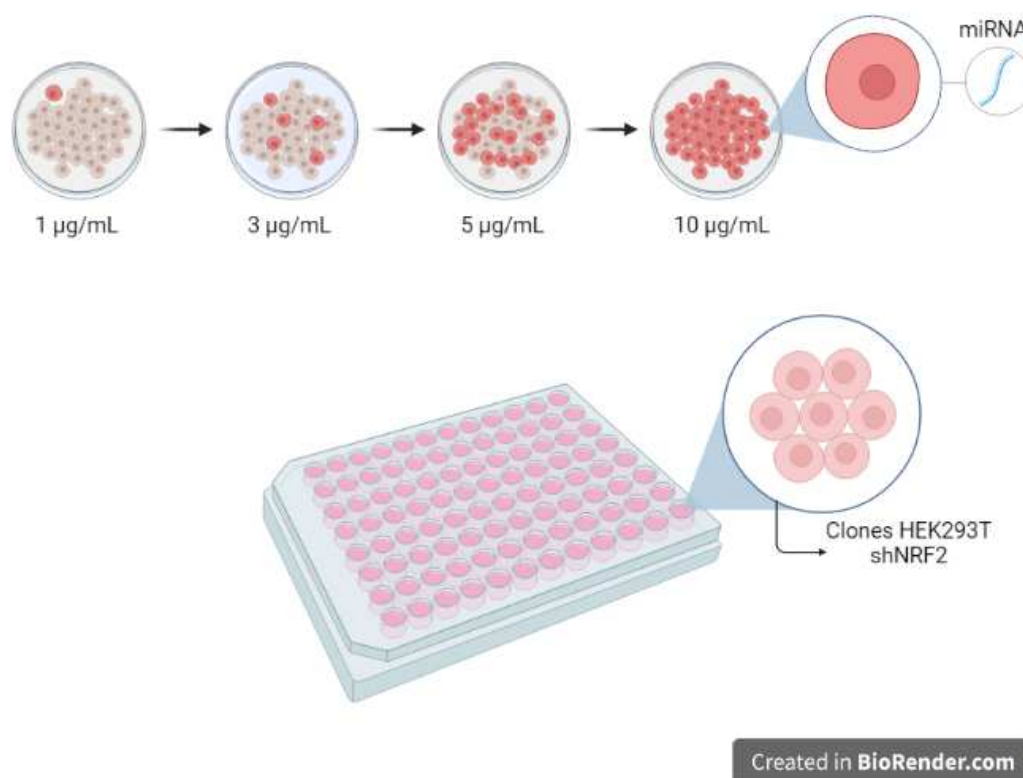
**Figura 5:** Processo da transfecção



Fonte: Autor, via Biorender

### 3.4.5 Acompanhamento da estabilidade e Seleção das células NF2/KO

As células que passaram pelo processo de transfecção foram acompanhadas durante todo o aumento de concentrações gradativas de puromicina como visto na (FIGURA 6), sendo as concentrações de 1  $\mu\text{g/mL}$ , 3  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$  e 10  $\mu\text{g/mL}$ . Após a chegada na concentração máxima de 10  $\mu\text{g/mL}$  as células foram repicadas em placas de 96 poços com a quantidade de 10-100 células por poço de maneira que obtivemos uma população homogênea de células contendo o plasmídeo, essas células foram chamadas de “clones” e consideradas resistentes ao meio com puromicina. Foram selecionados 10 clones competentes aos quais foram repicados em placa para crescimento e posterior coleta de pellet e congelamento.

**Figura 6:** Seleção de clones HEK293T shNrf2

Fonte: Autor, via Biorender

### 3.4.6 Análise da Reação da cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

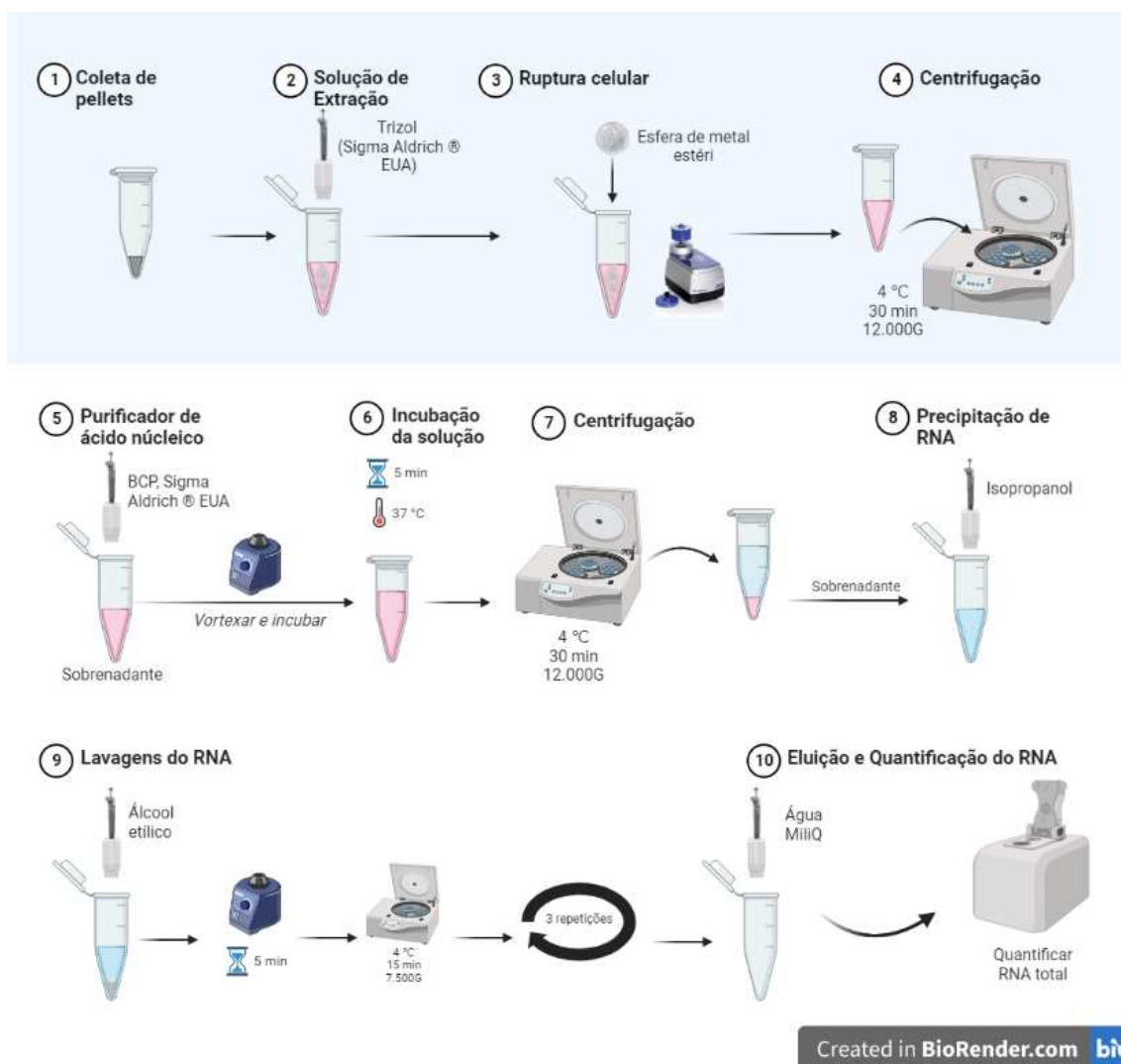
Avaliação da expressão gênica de Nrf2 em células Nrf2/KD, para confirmar supressão do gene. Para isso foram realizados os seguintes processos.

### 3.4.7 Extração do RNA total

Os pellets de células congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , advindo da seleção com puromicina, foram utilizados para a extração de RNA total. Procedeu-se com uma solução com trizol (Sigma Aldrich ® EUA), e cada pellet foi macerado por meio de

uma esfera de metal estéril no equipamento TissueLyzer LT® (Qiagen, EUA), continuado por de centrifugação a 4 °C na velocidade 12.000G por 30 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e adicionados 200 µL de 1-Bromo-3-Cloropropano (BCP, Sigma Aldrich ® EUA). Logo após, a solução foi vortexada por 15 segundos e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Continuou-se a extração centrifugando a última solução em temperatura de 4°C na velocidade de 12000G por um tempo de 30 minutos. Foi obtido um sobrenadante transparente, que continha o RNA isolado, o qual foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se ao sobrenadante, 500 uL de isopropanol, seguido de vortexação e centrifugação a 4 °C na velocidade de 12000G por 30 minutos. Deu-se a visualização de um precipitado, ao final da última centrifugação, que continha o RNA. Este precipitado foi lavado com 1000 µL de álcool etílico a 75%, vortexado por 15 segundos e centrifugado por 5 min a temperatura de 4 °C na velocidade de 7500G, repetindo-se a lavagem por 3 vezes. Após a terceira lavagem aspiramos completamente o álcool do microtubo, visando restar uma mínima quantidade deste líquido fosse completamente evaporada. Seguidamente efetuou-se a eluição em 20 µL de água MiliQ e do processo de extração, 1µL de RNA total de cada amostra foi dosado pelo Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, EUA) para verificação da qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA). Baseado na quantidade obtida, o RNA total foi diluído para uma concentração de 200 ng/µL e novamente quantificado por fluorimetria (Oubit 4.0 ® Thermo Fisher Scientific, EUA). Segue esquema do fluxo na (FIGURA 7)

**Figura 7:** Protocolo extração de RNA



Fonte: Autor, via Biorender

### 3.4.8 Síntese de cDNA

O RNA total isolado, armazenado a -80 °C, seguiu para a síntese de cDNA com base nas instruções do fabricante, por meio do GoScript cDNA Synthesis Kit (PROMEGA®, Wisconsin, EUA). O protocolo foi constituído por 2,5 µL da enzima transcriptase reversa, 5 µL do GoScript Reaction Buffer (solução constituída de oligonucleotídeos tampão salino e oligo dT), 200 ng/µL de RNA extraído das

amostras até o volume total até 20  $\mu$ L, o qual foi completado com água livre de nuclease. Seguidamente foram levadas as amostras para o termociclador Veriti Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific, EUA) sobre o protocolo padrão como visualizado na (FIGURA 8), sendo ele 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min e 70 °C por 15 min. O cDNA sintetizado ao final da reação foi preservado em freezer -20 °C até a amplificação pela Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR).

**Figura 8:** Protocolo cDNA



Created in BioRender.com 

Fonte: Autor, adaptado Biorender

### 3.4.9 RT-qPCR

A (TABELA 1) a seguir mostra os *primers* dos genes investigados, estes obtidos através do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Tabela 1:** Sequência de *primers* RT-qPCR

Gene	Sequência senso 5'3 (Forward)	Sequência anti-senso 5'3 (Reverse)
Nrf2	TCCAAGTCCAGAAGCCAAACTGAC	GGAGAGGATGCTGCTGAAGGAATC
beta-actina	ATCCTCACCTGAAGTACCC	CAGCCTGGATAGCAACGTAC

Os constituintes da reação foram 7,5 µL GoTaq® qPCRMaster Mix (PROMEGA, Wisconsin, EUA), 2,4 µL dos iniciadores e 1 µL de cDNA das amostras, completando o volume reacional de 15 µL de com água livre de nuclease. O protocolo no QuantiStudio 5.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA) tem os seguintes parâmetros; ativação da enzima à 95° por 2 min, 45 ciclos com etapas de desnaturação por 15 segundos à 95°, seguidos de anelamento e extensão por 1 minuto à uma temperatura de 60°, esquema pode ser visualizado na (FIGURA 9). Os resultados foram expressos no software do próprio equipamento e os valores quantitativos para os genes testados foram exportados para *Microsoft Excel* (Microsoft, Estados Unidos) e seguiram para análise estatísticas.

**Tabela 2:** Composição da reação, *MasterMix*

		<i>B-actin</i>	Nrf2
Reagentes	1x	9x	9x
Enzima GoTaq®	7,5 µL	67,5 µL	67,5 µL
Forward	2,4 µL	21,6 µL	21,6 µL
Reverse	2,4 µL	21,6 µL	21,6 µL
DNA	1,0 µL	-	-
H2O	1,7 µL	15,3 µL	15,3 µL
Volume total	15 µL	135 µL	135 µL

Fonte: Autor. O Master Mix é uma solução mãe dos reagentes, posteriormente será distribuído nos 9 microtubos devido ser triplicada das 3 amostras escolhidas para análise para teste em cada reagente com a adição de 1 µL de amostra cada.

**Figura 9:** Protocolo RT-qPCR com enzima da Promega



Created in [BioRender.com](https://BioRender.com)

Fonte: Autor, adaptado Biorender

### 3.4.10 Análise Estatística

Os grupos células HEK293T, HEK+shCtrl, HEK+shNrf2 terão sua análise da expressão gênica de RT-PCR será feita pelo teste Mann-Whitney.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células HEK293T apresentam uma leve aderência às placas de petri como observado durante o cultivo celular, notou-se que para a retirada dela para formação de pellets não era necessário a utilização de tripsina. Devido tais características foi adaptado a sua rotina a utilização apenas de PBS para lavagem e retirada dela da placa de cultivo. Esta adaptação, visa reduzir os impactos do uso de tripsina no cultivo celular como visto em (SALEHINEJAD, 2012; MIYAWAKI-KUWAKADO, 2021) Células expostas a tripsina por longos períodos, apresentam alterações das características morfológicas e genéticas proporcionais a exposição.

Os protocolos de crescimento, isolamento e purificação de plasmídeo em bactérias seguiu-se de maneira eficiente conforme fabricante (Thermo Fisher Scientific, EUA). Esta metodologia gerou estoque de bactérias produtoras de plasmídeo as quais foram adicionadas ao Biobanco do Núcleo de Biomedicina (NUBIMED) da Universidade Federal do Ceará(UFC). Além disso, foi adicionado ao estoque estas células vazias, de maneira que em futuro próximo a inserção de outros plasmídeos contribuirá para estudo de novos alvos moleculares.

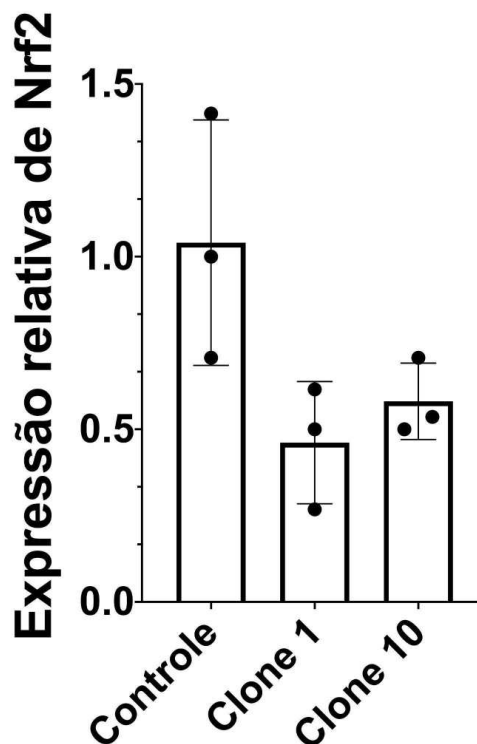
Durante a transfecção na etapa de incubação do lipossoma (Escort IV), com o plasmídeo foram realizados dois tempos de incubação de 8 horas e overnight com base no protocolo Escort™ IV Transfection Reagent (MERCK, 2022). Como resultado, foi observado que após a incubação overnight a população de células shNrf2 apresentava maior tempo de recuperação em comparação ao controle, observando-se a sobrevivência de uma menor população de células. Logo, pressupõe-se que a incubação durante todo o período da noite aumentou a efetividade da transfecção, já que as células Nrf2/KD têm menor resistência a estresse oxidativo justamente pelo silenciamento genético. Este resultado condiz com o encontrado por (CASTRO,2014) que reforça a efetividade da transfecção pelo tempo de exposição ao lipossoma.

As células transfectadas tiveram um período de recuperação de 72 horas, em seguida foi iniciado a seleção das células com puromicina. Este antibiótico é um amino nucleosídeo e seu mecanismo de ação consiste na interferência na transferência de peptídeos no ribossomo, causando morte celular por alteração da

tradução de mRNA. A resistência à puromicina está presente no plasmídeo pela presença do gene de produção da N-acetiltransferase. Células de mamíferos comuns são sensíveis a concentrações de 2 µg/mL a 5 µg/mL (Thermo Fisher Scientific, 2022). Logo, seguindo a literatura as células foram tratadas em concentrações crescentes de puromicina, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL, a cada tratamento às células eram colocadas para estabilização do crescimento de até 72h. Após recuperação elas eram coletadas e uma parte era congelada para estoque de segurança e repicadas para crescimento para continuidade da seleção na próxima concentração. Este processo foi continuado por três meses até a obtenção da concentração de 10 µg/mL, onde foram coletadas as células para seleção de clones puros e homogêneos em placas de 96 poços. Esta etapa final, as células foram mantidas em 10 µg/mL, e foram deixadas para crescimento de clones, a seleção final dos clones de células HEK293T shNrf2 foi feita de maneira qualitativa, observando as características estruturais das células, sendo descartadas células com alterações na morfologia celular. Assim, foram selecionados 10 clones desta linha experimental.

Os resultados do RT-qPCR na (FIGURA 10) evidenciam as alterações na expressão do Nrf2 em células HEK293T Nrf2/KD em comparação com células controle de HEK293T, conforme figura abaixo.

Figura 10: Diminuição expressão gênica de Nrf2 em células *knockdown*



Os resultados mostram a diminuição da expressão de Nrf2 pela metade, confirmando assim a efetividade do protocolo para *Knockdown*. Esta redução demonstra um forte indicativo sobre a capacidade da metodologia de entregar KD em células HEK293T, em um momento futuro será realizada uma repetição do experimento, buscando aumentar o N das amostras coletadas para obter um valor estatístico para análise. Este resultado condiz com o encontrado em literatura por (Ji, 2014) onde, através de metodologia semelhante de transfecção por plasmídeo, conseguiu silenciar o gene Nrf2, tendo a expressão desta proteína diminuída em todas as linhagens celulares de sua linha experimental.

Mais adiante estas células shNrf2 serão utilizadas em experimentos para validar os mecanismos de ação de compostos naturais como o gingerol. Estudos anteriores sugerem que os gingeróis exercem efeito nefroprotetor devido à sua atividade antioxidante mediada pela ativação da via do Nrf2 como proposto por (SILVA, 2021). Portanto, estas células poderão ser utilizadas na investigação do mecanismo de ação do gingerol e outros compostos no futuro.

A relevância clínica deste trabalho se dá como visto em (ZHANG,2017; HUANG, 2021; MIRZAEI, 2021) ,onde a evidenciação de compostos que trabalham ou aumentam a expressão de Nrf2, se configuram como agentes importantes frente

a estresse oxidativo na formação de patologias decorrentes de oto,neuro e nefrotoxicidade.

Este trabalho obteve 10 clones de células HEK293T cuja transfecção foi observada pela capacidade de sobreviver a 10ug/mL de puromicina e redução da expressão do gene Nrf2 em até 50%. Os clones obtidos por este trabalho foram armazenados no biobanco do NUBIMED da universidade federal do Ceará. Estas células estarão armazenadas a -150°C o que permitirá armazenamento válido por até 25 anos.

## 5. CONCLUSÃO

O Nrf2 é um importante regulador de mecanismos que combatem o estresse oxidativo celular, seja em reações inflamatórias provenientes do organismo ou exógenas. Diante disso, células shNrf2 são de grande relevância para estudos do mecanismo de ação de substâncias antioxidantes, evidenciando os mecanismos de proteção celular desencadeados pelo fator transcrição mestre Nrf2 e os genes o qual regula. Este modulador genético atua na proteção do organismo por diversas vias, seja por meio de componentes do ARE ou pela via do GSH. Portanto, a participação do Nrf2 na resposta antioxidante de uma substância pode proporcionar associações sinérgicas para um tratamento com melhor efetividade na remediação de radicais livres provenientes de estresses oxidativos.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, David D. et al. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 31, n. 8, p. 757-768, 2005.

CALABRESE, Edward J.; KOZUMBO, Walter J. The hormetic dose-response mechanism: Nrf2 activation. **Pharmacological Research**, v. 167, p. 105526, 2021.

CASTRO, Fernanda Cavallari de. Silenciamento gênico do BMPRII em células da granulosa bovinas. 2014. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

DEKEVIC, Gregor et al. Statistical experimental designs to optimize the transient transfection of HEK 293T cells and determine a transfer criterion from adherent cells to larger-scale cell suspension cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 346, p. 23-34, 2022.

FISCHER, Fabian C. et al. Cellular Metabolism in High-Throughput In Vitro Reporter Gene Assays and Implications for the Quantitative In Vitro–In Vivo Extrapolation. **Chemical research in toxicology**, v. 33, n. 7, p. 1770-1779, 2020.

HAN, Haiyong. RNA interference to knock down gene expression. **Disease Gene Identification**, p. 293-302, 2018.

HUANG, Qi; OUYANG, Dong-Sheng; LIU, Qiong. Isoeucemmin A attenuates kidney injury in diabetic nephropathy through the Nrf2/HO-1 pathway. **FEBS Open bio**, v. 11, n. 8, p. 2350-2363, 2021.

Ji, Xiangjun et al. Knockdown of Nrf2 suppresses glioblastoma angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 $\alpha$ . **International journal of cancer**, v. 135, n. 3, p. 574-584, 2014.

JIA, Zisen et al. CRISPR-Cas9-Mediated NPC1 Gene Deletion Enhances HEK 293 T Cell Adhesion by Regulating E-Cadherin. **Molecular Biotechnology**, p. 1-11, 2022.

KANASTY, Rosemary et al. Delivery materials for siRNA therapeutics. **Nature materials**, v. 12, n. 11, p. 967-977, 2013.

KARRA, Daniela; DAHM, Ralf. Transfection techniques for neuronal cells. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 18, p. 6171-6177, 2010.

KIM, Tae Kyung; EBERWINE, James H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 8, p. 3173-3178, 2010.

KHOR, Tin Oo; YU, Siwang; KONG, Ah-Ng. Dietary cancer chemopreventive agents–targeting inflammation and Nrf2 signaling pathway. **Planta medica**, v. 74, n. 13, p. 1540-1547, 2008.

MAJZOUB, Joseph A.; MUGLIA, Louis J. Knockout mice. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 14, p. 904-906, 1996.

MATHER, Jennie P.; ROBERTS, Penelope E. Introduction to cell and tissue culture: theory and technique. **Springer Science & Business Media**, 1998.

MERCK. **Sigmaaldrich**, ano 2022. Transfection & Gene Editing Escort™ IV Transfection Reagent Protocol. Disponível em:  
<<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/transfection-and-gene-editing/escort-4-transfection-reagent>>.

Acesso em: 06 de novembro de 2022

MIRZAEI, Sepideh et al. Nrf2 signaling pathway in cisplatin chemotherapy: Potential involvement in organ protection and chemoresistance. **Pharmacological research**, v. 167, p. 105575, 2021.

MIYAWAKI-KUWAKADO, Atsuko et al. Transcriptome analysis of gene expression changes upon enzymatic dissociation in skeletal myoblasts. **Genes to Cells**, v. 26, n. 7, p. 530-540, 2021.

ROCHA, Clarissa Ribeiro Reily et al. Nrf2 and glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 48081, 2016

SALEHINEJAD, Parvin et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 48, n. 2, p. 75-83, 2012.

SALOZHIN, S. V.; BOL'SHAKOV, A. P. Transfection of nerve cells. **Neuroscience and behavioral physiology**, v. 40, n. 3, p. 269-277, 2010.

SHINOHARA, Fumikazu et al. siRNA potency enhancement via chemical modifications of nucleotide bases at the 5'-end of the siRNA guide strand. **RNA**, v. 27, n. 2, p. 163-173, 2021.

SILVA, Dayara de Oliveira. Análise do papel protetor do complexo [6]-gingerol- $\beta$ -ciclodextrina frente à nefrotoxicidade induzida por cisplatina. 2021.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. **Gene**, v. 569, n. 2, p. 182-190, 2015.

THERMOFISHER. **ThermoFisher**, ano 2022. Puromycin. Disponível em: <<https://www.thermoFisher.com/br/pt/home/life-science/cell-culture/transfection/selecti-on/puromycin.html>>. Acesso em: 08 de novembro de 2022

YANO, Hirokazu et al. Reconsidering plasmid maintenance factors for computational plasmid design. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 17, p. 70-81, 2019.

ZHANG, Yu et al. Simvastatin attenuates renal ischemia/reperfusion injury from oxidative stress via targeting Nrf2/HO-1 pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 5, p. 4460-4466, 2017.

ZHAO, Shuiling et al. Nrf2 deficiency upregulates intrarenal angiotensin-converting enzyme-2 and angiotensin 1-7 receptor expression and attenuates hypertension and nephropathy in diabetic mice. *Endocrinology*, v. 159, n. 2, p. 836-852, 2018.