



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

**ANA CAROLINE BORGES LIMA**

**TRANSFECCÃO DO GENE GUCA2A CODIFICANTE DA GUANILINA EM  
CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE RIM HUMANO (HEK 293T)**

**FORTALEZA**

**2025**

**ANA CAROLINE BORGES LIMA**

**TRANSFECCÃO DO GENE GUCA2A CODIFICANTE DA GUANILINA EM  
CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE RIM HUMANO (HEK 293T)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Freitas Clementino

Coorientadora: Me. Dayara de Oliveira Silva

**FORTALEZA**

**2025**

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)

---

- L696t Lima, Ana Caroline Borges.  
Transfecção do Gene GUCA2A Codificante da Guanilina em Células Embrionárias de Rim Humano (HEK 293T) / Ana Caroline Borges Lima. – 2025.  
44 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Prof. Dr. Marco Antonio de Freitas Clementino .  
Coorientação: Profa. Ma. Dayara de Oliveira Silva.
1. GUCA2A. 2. Transfecção. 3. HEK 293T. 4. Guanilina. 5. Proteína EGFP. I. Título.
- CDD 615
-

ANA CAROLINE BORGES LIMA

TRANSFECCÃO DO GENE GUCA2A CODIFICANTE DA GUANILINA EM CÉLULAS  
EMBRIONÁRIAS DE RIM HUMANO (HEK 293T)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Aprovada em 14/07/2025.

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)

Aos meus pais, Arneide e Raimundo, que nunca mediram esforços para que eu conseguisse realizar os meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, por nunca medirem esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada por todo o apoio e por sempre acreditarem em mim. Vocês são minha base, minha inspiração e minha maior motivação. Cada conquista minha é também de vocês.

Ao professor Marco Clementino, meu orientador, pela orientação e ensinamentos ao longo de toda a realização deste trabalho que contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao professor Alexandre Havt, por ter me recebido tão bem no seu laboratório, por ter aceitado o convite para compor a banca avaliadora deste trabalho e por todo o aprendizado proporcionado no seu laboratório.

Ao professor Tiago Sampaio, por aceitar o convite para compor a banca avaliadora deste trabalho. Sempre admirei o seu trabalho e tê-lo presente na minha banca é uma grande honra.

À minha irmã Camila, que sempre esteve comigo e me acolheu em Fortaleza de braços abertos, juntamente com o Igor. Vocês foram o suporte essencial para que eu pudesse concluir a minha graduação.

À minha amiga Cecília, que, mesmo morando longe, sempre me apoiou e incentivou, acreditando sempre no meu potencial.

Aos meus amigos da faculdade, Thaís, Laura, Vinícius, Matheus, Rômulo e Renato, que sempre estiveram comigo durante a graduação e fizeram essa jornada ser mais leve e divertida.

Aos pós-graduandos do laboratório, em especial Davi, Mikael, Joyce e Dayara, que sempre me auxiliaram e me ensinaram bastante durante a realização desse trabalho.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório, em especial a Flay que me acompanhou em boa parte deste trabalho.

Aos funcionários da Farmácia Escola, Emanuel e Jéssica, que foram fundamentais no meu processo de formação acadêmica, profissional e pessoal.

Ao Igor, meu namorado, que na reta final deste trabalho esteve comigo e foi minha base para conseguir enfrentar todas as dificuldades.

À minha família, que sempre acreditaram na minha capacidade e me incentivaram.

## RESUMO

A síntese de proteínas recombinantes constitui uma das ferramentas mais importantes da biotecnologia na atualidade, sendo amplamente utilizada em pesquisas biomédicas e no desenvolvimento de medicamentos. Esse processo envolve a introdução de material genético em células hospedeiras por meio da transfecção, utilizando vetores como os plasmídeos. Dentre os sistemas de expressão disponíveis, as células de mamíferos, como a linhagem HEK 293T, destacam-se por sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais essenciais à funcionalidade das proteínas humanas. Este trabalho teve como objetivo estabelecer um sistema experimental para a expressão do gene *GUCA2A* em células HEK 293T, visando a futura produção da proteína recombinante guanilina, de interesse terapêutico. A construção do plasmídeo recombinante contendo o gene *GUCA2A* foi realizada utilizando enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I, e a sua incorporação em cepas de *Escherichia coli* *dh5alpha* foi analisada por meio da Reação de Cadeia em Polimerase (PCR), resultando em uma amplificação das amostras nos ciclos iniciais. O DNA plasmidial foi extraído com pureza e concentração adequadas, conforme análise espectrofotométrica. As células HEK 293T foram cultivadas em condições controladas de temperatura e CO<sub>2</sub> e submetidas ao processo de transfecção por lipofecção. A eficiência da transfecção foi avaliada por microscopia de fluorescência, observando-se a expressão do marcador EGFP presente no vetor. A presença de fluorescência verde em diversas células indicou a incorporação do DNA plasmidial. Posteriormente, foi realizada a seleção com puromicina, permitindo o enriquecimento da população de células transfectadas. Após esse processo, observou-se que a morfologia celular foi preservada, demonstrando que a transfecção com o gene *GUCA2A* não comprometeu a integridade celular. Dessa forma, os resultados obtidos confirmam o sucesso nas etapas de clonagem, amplificação e transfecção com gene *GUCA2A* em células HEK 293T. O sistema estabelecido demonstrou-se eficiente e reprodutível, fornecendo base para futuras análises, como RT-qPCR, Western Blot e testes funcionais da proteína recombinante. Este trabalho contribui para o avanço no desenvolvimento de sistemas de expressão gênica voltados à produção de proteínas com potencial terapêutico.

**Palavras-chave:** *GUCA2A*; transfecção; HEK 293T; guanilina; proteína EGFP.

## ABSTRACT

The synthesis of recombinant proteins is one of the most important tools in modern biotechnology, widely used in biomedical research and drug development. This process involves introducing genetic material into host cells through transfection, using vectors such as plasmids. Among the available expression systems, mammalian cells—such as the HEK 293T cell line—stand out for their ability to perform post-translational modifications essential to the functionality of human proteins. This study aimed to establish an experimental system for the expression of the GUCA2A gene in HEK 293T cells, with the goal of producing the recombinant protein guanylin, which has therapeutic potential. The recombinant plasmid containing the GUCA2A gene was constructed using the restriction enzymes BamHI and XbaI, and its incorporation into *Escherichia coli* DH5alpha strains was analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR), showing early-cycle amplification. Plasmid DNA was extracted with suitable purity and concentration, as confirmed by spectrophotometric analysis. HEK 293T cells were cultured under controlled temperature and CO<sub>2</sub> conditions and transfected via lipofection. Transfection efficiency was assessed by fluorescence microscopy, observing the expression of the EGFP marker present in the vector. The presence of green fluorescence in multiple cells indicated plasmid DNA uptake. Subsequently, selection with puromycin enriched the population of transfected cells. Cell morphology remained preserved, indicating that transfection with the GUCA2A gene did not compromise cell integrity. The results confirmed the success of cloning, amplification, and transfection steps involving the GUCA2A gene in HEK 293T cells. The established system proved to be efficient and reproducible, providing a foundation for future analyses such as RT-qPCR, Western blot, and functional assays of the recombinant protein. This study contributes to advancing gene expression systems aimed at producing proteins with therapeutic potential.

**Keywords:** GUCA2A; transfection; HEK 293T; guanylin; EGFP protein.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do lipossoma.....	14
Figura 2 - Estrutura de um plasmídeo.....	16
Figura 3 - Estrutura do plasmídeo pVL-eGFP.....	17
Figura 4 - Curva de amplificação do gene GUCA2A.....	29
Figura 5 - Curva de dissociação.....	30
Figura 6 - Células HEK 293T transfectadas com o gene da Luciferase.....	33
Figura 7 - Células HEK 293T transfectadas com o gene GUCA2A e Luciferase.....	33
Figura 8 - Fluorescência das células HEK 293T transfectadas com o gene da GUCA2A.....	34
Figura 9 - Célula HEK 293T transfectadas com o gene GUCA2A sem fluorescência.....	35
Figura 10 - Células HEK 293T controle não fluorescentes.....	35
Figura 11 - Células HEK 293T controle.....	36

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Resultados da quantificação do DNA plasmidial.....	31
---------------------------------------------------------------	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
2.1	Transfecção de células.....	13
2.2	Produção de proteína recombinante.....	15
2.3	Plasmídeos recombinantes.....	16
2.4	Gene GUCA2A.....	19
2.5	Gene luciferase.....	20
2.6	Linhagem celular HEK 293T.....	21
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
4.1	Objetivo geral.....	23
4.2	Objetivos específicos.....	23
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
5.1	Incorporação do DNA heterólogo no vetor plasmidial.....	24
5.2	Crescimento da cepa bacteriana modificada.....	24
5.3	Extração do DNA plasmidial recombinante.....	25
5.4	Quantificação do DNA plasmidial recombinante.....	26
5.5	Cultivo das células HEK-293T.....	26
5.6	Transfecção celular.....	27
5.7	Tratamento com puomicina.....	27
5.8	Visualização da fluorescência.....	28
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
6.1	Incorporação do gene GUCA2A no plasmídeo vetor em <i>E. coli</i> dH5alpha.....	30
6.2	Crescimento da bactéria modificada com o plasmídeo recombinante.....	31
6.3	Extração do DNA plasmidial recombinante.....	32
6.4	Quantificação do DNA plasmidial recombinante.....	32
6.5	Transfecção celular e tratamento com puomicina.....	33
6.6	Fluorescência celular.....	35

<b>6.7</b>	<b>Análises de dados.....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de proteínas recombinantes é considerada uma das ferramentas mais importantes da biotecnologia na atualidade, sendo amplamente aplicada na pesquisa científica e na indústria farmacêutica. Essa técnica permite a síntese de proteínas específicas em sistemas biológicos modificados geneticamente, com o objetivo de compreender suas funções, desenvolver terapias inovadoras e criar produtos biotecnológicos. Para a realização da modificação genética, a fim de produzir essas proteínas, é preciso que ocorra a introdução do material genético nas células hospedeiras, processo conhecido como transfecção celular (Hahimi *et al.*, 2018; Cocchiaro *et al.*, 2022).

O sucesso do processo da transfecção celular depende de diversos fatores, como o método utilizado para facilitar a entrada do material genético na célula. Esses métodos podem ser físicos, químicos ou biológicos, sendo escolhido a depender da finalidade desejada (Chong *et al.*, 2021; Hahimi *et al.*, 2018). Um método bastante utilizado para transfecção é a lipofecção, por conta da sua simplicidade, baixo custo e aplicabilidade em diferentes tipos celulares (Guimarães, 2019).

Além dos métodos facilitadores para a inserção do material genético na célula, há também o uso de vetores para a inserção do material genético no interior da célula. Os vetores podem ser classificados como virais ou não virais, sendo os não virais mais seguros, por apresentarem baixa imunogenicidade e citotoxicidade. Dentre os vetores não virais está o plasmídeo, amplamente utilizado para modificação genética de células (Ramamoorth; Narvekar, 2015; Tsang, 2017).

Os sistemas de expressões utilizados para a produção de proteínas recombinantes podem ser organismos procariotos, como as bactérias, ou organismos eucariotos, como leveduras e linhagens celulares de mamíferos. A síntese de proteínas recombinantes em bactérias é vantajosa por ser de baixo custo, de fácil operação e, assim, mais utilizada para a produção em larga escala. Porém, há uma limitação na produção de proteínas pelas bactérias por não conseguirem realizar modificações pós-traducionais, não conseguindo, então, sintetizar proteínas mais complexas (Fu *et al.*, 2024; Reis, 2024).

Para a produção de proteínas que requerem modificações pós-traducionais, os sistemas de expressão eucarióticos tornam-se indispensáveis. Os mais utilizados são as linhagens celulares de mamíferos, como as células de ovário de hamster chinês (CHO) e as células embrionárias de rim humano (HEK 293). Apesar de possuírem um custo mais elevado e um tempo maior para o cultivo, essas linhagens celulares possibilitam a produção de

proteínas recombinantes funcionais, sendo importante para o uso em aplicações terapêuticas (Tan *et. al.*, 2021; Queiroz, 2023; Fu *et.al.*, 2024).

A linhagem celular HEK 293 é amplamente utilizada na expressão de proteínas recombinantes devido à sua capacidade eficiente de processamento pós-traducional (Paschoal, 2016; Fu *et al.*, 2024). A variante HEK 293T apresenta crescimento rápido em cultura aderente, facilitando a produção em larga escala e a seleção de clones produtores, sendo assim uma ferramenta valiosa na biotecnologia (Portolano, 2014; Barros, 2019).

A guanilina é um peptídeo bioativo produzido pela mucosa intestinal, que atua como um ligante do receptor guanilato ciclase-C (GC-C), desempenhando um papel fundamental na regulação da homeostase de fluidos e manutenção da integridade do epitélio intestinal. Esse peptídeo é codificado pelo gene *GUCA2A* (Ershow *et. al.*, 2023; Tian *et. al.*, 2025). A sinalização via GC-C é essencial para a fisiologia intestinal, e sua disfunção está associada a distúrbios gastrointestinais, como constipação, diarreia e até o desenvolvimento de pólipos e tumores (Brenna *et. al.*, 2015).

A produção de proteínas recombinantes representa uma estratégia essencial para aplicações científicas e terapêuticas, sendo viabilizada por métodos eficientes de transfecção celular, vetores apropriados e sistemas de expressão adequados à complexidade da proteína alvo. A linhagem HEK 293T, amplamente utilizada por sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais, torna-se especialmente relevante para a produção de peptídeos bioativos humanos, como a guanilina, codificada pelo gene *GUCA2A*. Estudar a expressão recombinante dessa proteína permite não apenas compreender melhor seus mecanismos fisiológicos, mas também abre caminho para futuras aplicações terapêuticas no tratamento de distúrbios gastrointestinais associados à disfunção do eixo GC-C.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Transfecção de células

A transfecção celular é um procedimento amplamente utilizado em experimentos *in vitro*, permitindo a introdução de material genético, como DNA ou RNA, no interior das células. Essa técnica possibilita a modulação da expressão e/ou da atividade de proteínas específicas, sendo essencial para o estudo das funções gênicas e para a compreensão de diversos processos biológicos. Nesse contexto, a clonagem gênica viabiliza a obtenção de DNA recombinante, composto por duas ou mais sequências de DNA combinadas artificialmente (Hahimi *et al.*, 2018; Cocchiaro *et al.*, 2022).

A transfecção celular pode ser classificada em transitória e estável. A transfecção transitória acontece quando os ácidos nucleicos não são incorporados ao genoma da célula transfectada, podendo a expressão do gene de interesse ser perdida com a replicação das células. Já a transfecção estável é quando os ácidos nucleicos conseguem ser integrados ao genoma da célula hospedeira ou então são mantidos como um epissomo, ou seja, um elemento extracromossômico que consegue ser expressado à longo prazo (Chong *et al.*, 2021).

As construções vetoriais utilizadas para a transfecção de ácidos nucleicos específicos podem ser classificadas em dois tipos principais: vetores virais e vetores não virais. Ambos atuam facilitando a expressão de um transgene exógeno por meio da inclusão de um promotor eucariótico apropriado. No entanto, enquanto os vetores virais têm potencial para induzir respostas imunogênicas na célula hospedeira, os vetores não virais, como os plasmídeos, tendem a apresentar menor imunogenicidade (Chong *et al.*, 2021).

Para que o DNA possa ser replicado e analisado, é necessária sua introdução em células hospedeiras apropriadas, como bactérias, células de insetos ou de mamíferos. A inserção de ácidos nucleicos recombinantes pode ser realizada por diferentes métodos, sendo eles físicos, químicos ou biológicos, utilizando agentes como reagentes de transfecção, fosfato de cálcio, polibreno ou polietilenimina, que facilitam a entrada do material genético nas células e promovem modificações genéticas estáveis ou transitórias, de acordo com os objetivos experimentais (Hahimi *et al.*, 2018; Cocchiaro *et al.*, 2022).

Reagentes como dendrímeros, DEAE-dextrano e lipídios catiônicos atuam envolvendo o DNA ou RNA, que possui carga negativa, conferindo à estrutura uma carga positiva ou neutralizada. Esse processo facilita a interação com a membrana celular, que também é carregada negativamente, promovendo a entrada eficiente do material genético nas

células, inclusive em linhagens celulares mais difíceis de serem transfectadas (Hahimi *et al.*, 2018).

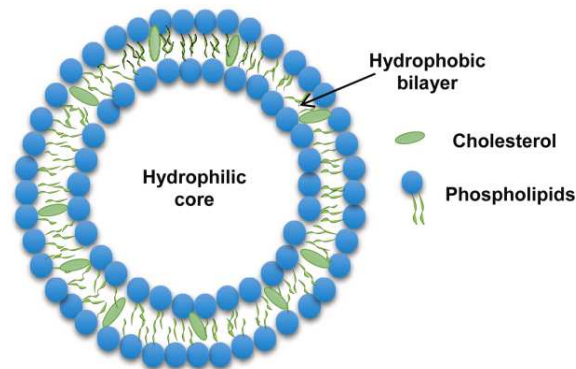
Entre os reagentes disponíveis, destacam-se os à base de lipídios, como os lipossomos, que formam vesículas catiônicas capazes de interagir com DNA exógeno e facilitar sua entrada na célula por meio da fusão com a membrana plasmática. Essa abordagem é eficaz mesmo em células resistentes a outros métodos, como fosfato de cálcio ou DEAE-dextrano (Hahimi *et al.*, 2018, Chong *et al.*, 2021).

Os reagentes de transfecção podem ser utilizados tanto em experimentos de expressão gênica transitória quanto em expressões estáveis, nas quais o DNA é integrado ao genoma da célula hospedeira. Além disso, são aplicáveis em estudos *in vivo*, possibilitando a entrega de DNA ou RNA diretamente em organismos animais e humanos. A escolha do reagente ideal depende de diversos fatores, como a linhagem celular utilizada, o tipo de molécula a ser transferida e os objetivos experimentais, se são transitórios ou estáveis. A otimização das condições de transfecção é essencial para que seja alcançada uma alta eficiência (Hahimi *et al.*, 2018).

A transfecção mediada por lipídios apresenta ampla aplicabilidade devido à sua simplicidade, baixo custo e compatibilidade com sistemas de alto rendimento, sendo considerada uma das metodologias mais empregadas em estudos de biotecnologia e biologia molecular (Hahimi *et al.*, 2018).

A lipofecção é uma técnica de transfecção que utiliza lipossomos como vetores para introdução de material genético no interior das células. Os lipossomos são vesículas microscópicas coloidais formadas por autoagregação de lipídios anfifílicos, organizando-se em bicamadas lipídicas concêntricas que envolvem compartimentos aquosos, como mostrado na figura 1. Esse sistema lipossomal é capaz de encapsular substâncias hidrofílicas em seu interior aquoso, bem como incorporar compostos lipofílicos na membrana lipídica. Devido às suas propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa imunogenicidade, os lipossomos se mostram altamente versáteis, sendo amplamente utilizados em pesquisas científicas, aplicações terapêuticas, alimentares e analíticas (Guimarães, 2019).

**Figura 1 - Estrutura do lipossoma**



Fonte: Nsairat, 2022.

A eficácia da lipofecção depende de diversos fatores, entre os quais se destacam: a adequada condensação do DNA na estrutura do lipoplexo, sua proteção contra a degradação por nucleases intra e extracelulares, a adesão do complexo lipídio-DNA à membrana celular, a internalização do lipoplexo por endocitose, a desestabilização da membrana endossômica, o escape do DNA para o citoplasma, o transporte até o núcleo, a dissociação do DNA do lipídio catiônico e, por fim, a expressão gênica eficiente. As interações entre os lipossomos catiônicos e o DNA ocorrem por meio de ligações eletrostáticas, resultantes das diferenças de carga entre essas moléculas (Düzgüne, 2003; Guimarães, 2019).

## 2.2 Produção de proteína recombinante

As proteínas recombinantes são originadas a partir de sequências específicas de DNA e produzidas em organismos hospedeiros heterólogos, que são geneticamente modificados para expressar a proteína desejada (Reis, 2024). A participação dos biofármacos na indústria farmacêutica tem crescido bastante, impulsionada pela expansão do mercado e pelo aumento da demanda por terapias biotecnológicas. Um dos principais segmentos desse setor é a produção de proteínas terapêuticas recombinantes. Diversos sistemas de expressão são empregados para esse fim, como bactérias, leveduras, células vegetais e, principalmente, linhagens celulares de mamíferos (Fu *et al.*, 2024).

A expressão de proteínas recombinantes em organismos procariontes, como em bactérias, foi a primeira estratégia desenvolvida nessa área e permanece como uma das mais utilizadas devido à sua eficiência e simplicidade. Entre as principais vantagens desse sistema estão o baixo custo operacional, o rápido tempo de duplicação bacteriana e a facilidade de manipulação genética, podendo ser facilmente escalonado para volumes industriais. O

processo de expressão envolve a inserção do gene de interesse em um vetor plasmidial, seguido da transformação do organismo hospedeiro e indução da expressão. Em geral, em menos de uma semana já é possível avaliar a produção da proteína recombinante em bactérias como a *Escherichia coli* (Reis, 2024).

No entanto, a produção de proteínas recombinantes complexas em organismos procariontes apresenta limitações, especialmente aquelas que requerem modificações pós-traducionais específicas de eucariotos, como glicosilação, visto que as bactérias não conseguem realizar essas modificações. Desse modo, a função das proteínas podem ser afetadas, já que a estrutura das proteínas está diretamente ligada às suas interações e funcionalidades (Reis, 2024).

O uso de linhagens celulares de mamíferos, organismos eucariontes, permite que ocorra a síntese de produtos biológicos com modificações pós-traducionais complexas, e, dentre as linhagens celulares utilizadas estão as células de ovário de hamster chinês (CHO) e as células humanas de rim embrionário (HEK 293) (Tan *et. al.*, 2021; Fu *et. al.*, 2024). Além das linhagens celulares de mamíferos, as leveduras também são capazes de realizar as modificações pós-traducionais (Reis, 2024).

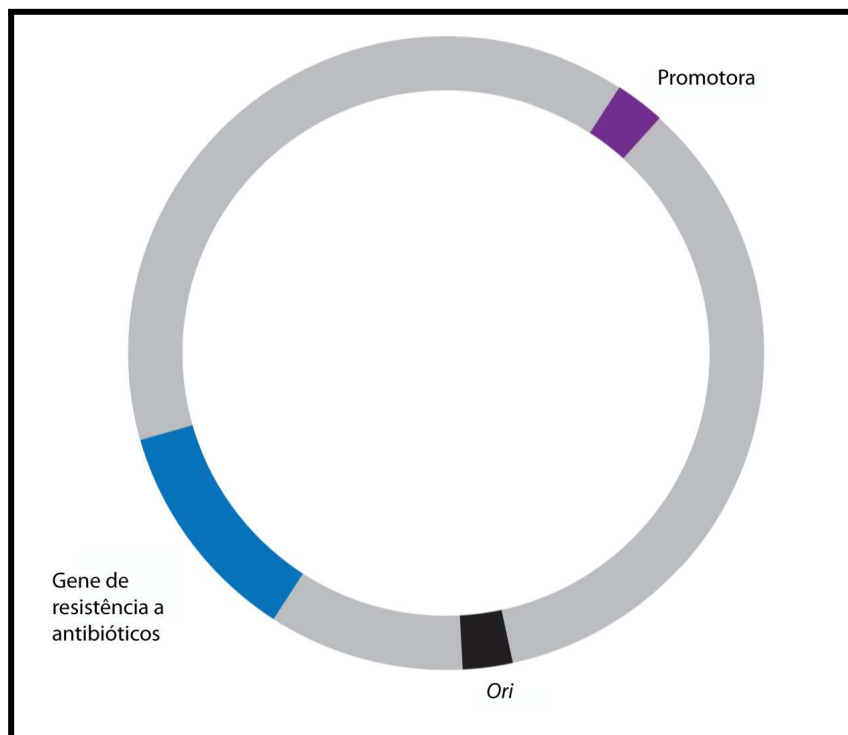
Sistemas de expressão eucarióticos, embora mais caros e lentos que os procariotos, são essenciais para a produção de proteínas que requerem modificações pós-traducionais (MPTs) compatíveis com as de mamíferos. Essas modificações incluem dobramento proteico mediado por chaperonas, glicosilação, formação de pontes dissulfeto e transporte intracelular adequado. Tais alterações influenciam diretamente em características importantes da proteína expressa, como sua estrutura, atividade biológica, solubilidade e antigenicidade. Por isso, esses sistemas são fundamentais quando se busca preservar a funcionalidade inicial da proteína (Queiroz, 2023).

### **2.3 Plasmídeos recombinantes**

Bactérias frequentemente possuem elementos genéticos móveis que podem ser transmitidos entre diferentes células bacterianas. Um exemplo desses elementos é o plasmídeo, uma pequena molécula circular de DNA de fita dupla. Os plasmídeos podem ser herdados pelas células-filhas durante a divisão celular, caracterizando a transferência vertical, ou podem ser transferidos para células não descendentes por meio da transferência horizontal. Este último processo pode ocorrer tanto entre bactérias da mesma espécie quanto entre espécies distintas (Tsang, 2017).

Os plasmídeos carregam genes que conferem vantagens adaptativas ao hospedeiro, como resistência a antimicrobianos ou capacidade de metabolizar determinados compostos. No entanto, a presença de um plasmídeo também representa um custo metabólico, devido à necessidade de replicação adicional e à expressão de genes plasmidiais. Assim, na ausência de pressões seletivas que justifiquem sua manutenção, o plasmídeo pode ser perdido, uma vez que deixa de oferecer um benefício competitivo à célula hospedeira (Tsang, 2017).

**Figura 2 - Estrutura de um plasmídeo**



Fonte: Amgen Biotech Experience © Fundação Amgen

Os genes presentes em um plasmídeo são divididos em dois grupos: os que possuem função específica do plasmídeo e os que afetam principalmente o fenótipo do hospedeiro. Os genes que garantem a funcionalidade do próprio plasmídeo compõem a estrutura básica, enquanto os demais genes presentes, que conferem características adicionais ao hospedeiro, são denominados genes acessórios ou de carga útil. Os genes de carga útil mais estudados são os de resistência a antibióticos, frequentemente encontrados em uma ampla variedade de hospedeiros (Dewan; Uecker, 2023).

Dentre os genes de manutenção do plasmídeo, há os genes responsáveis pela replicação do plasmídeo, incluindo a origem da replicação vegetativa (OriV), ou seja, a sequência na qual a replicação do plasmídeo começa, além dos genes que codificam proteínas



## 2.4 Gene GUCA2A

O gene GUCA2A (Guanylate Cyclase Activator 2A) codifica a guanilina (GN), um peptídeo bioativo sintetizado pela mucosa intestinal, que atua como ligante endócrino do receptor guanilato ciclase-C (GC-C). A guanilina exerce funções essenciais na regulação da homeostase de fluidos intestinais e na manutenção da fisiologia do epitélio intestinal. A forma biologicamente ativa da guanilina é composta por 15 aminoácidos derivados da porção C-terminal de um precursor maior, denominado pré-proguanilina, que contém uma sequência sinal (resíduos 1–21) e uma sequência de proguanilina (resíduos 22–115) (Ershov *et al.*, 2023; Tian *et al.*, 2025).

Embora alguns estudos indiquem que a proguanilina seja a principal forma secretada do peptídeo, a via enzimática responsável pela conversão da proguanilina em sua forma ativa ainda não está completamente elucidada. A guanilina contém quatro resíduos de cisteína, que permitem a formação de duas ligações dissulfeto intramoleculares, as quais são fundamentais para manter a conformação estrutural necessária para sua interação com o receptor GC-C (Ershov *et al.*, 2023).

A sinalização mediada pela guanilato ciclase-C (GC-C/GUCY2C) desempenha um papel essencial na fisiologia intestinal, e sua disfunção tem sido associada a diversas alterações patológicas, como diarreia, constipação, dor abdominal, comprometimento da barreira epitelial e desenvolvimento de pólipos e tumores. Os principais ligantes endógenos desse receptor transmembranar são os peptídeos guanilina (GN/GUCA2A) e uroguanilina (UGN/GUCA2B). Ambos são expressos em diversos tecidos do organismo, com predominância no epitélio gastrointestinal, que constitui a principal fonte de produção dessas moléculas sinalizadoras (Brenna *et al.*, 2015). Os outros órgãos que também há evidências de que a guanilina pode atuar são os rins e o cérebro, embora com efeitos menos compreendidos que os da uroguanilina (Lima, Fontele, 2014).

Além disso, o receptor GC-C pode ser ativado por enterotoxinas bacterianas do tipo ST, que são peptídeos homólogos à guanilina, com 19 aminoácidos e três ligações dissulfeto. A estrutura dessas toxinas confere uma maior afinidade e potência de ativação do GC-C em comparação com os ligantes endógenos. A guanilina apresenta duas isoformas estruturais, uma com rotação dextrógira e outra levógira, que diferem quanto à sua atividade biológica e à afinidade pelo receptor, embora o mecanismo de interconversão entre essas formas ainda seja pouco compreendido (Brenna *et al.*, 2015; Ershov *et al.*, 2023).

Os esforços para identificar a origem celular da guanilina têm apontado diferentes tipos celulares do epitélio intestinal como possíveis fontes, incluindo células caliciformes, células de Paneth, células em tufo e enterócitos. No entanto, a literatura apresenta divergências quanto à identificação definitiva da célula produtora, em parte devido às variações metodológicas entre os estudos. Além disso, os estímulos fisiológicos que regulam a secreção de proguanilina ainda não são totalmente compreendidos, embora existam indícios de que essa liberação esteja associada à ingestão de sal (Ershov *et al.*, 2023).

Ikpa e colaboradores (2016), realizaram estudos em camundongos e encontraram que nas criptas de Lieberkühn, a expressão dos genes GUCA2A e GUCA2B foi identificada predominantemente em células da linhagem secretora localizadas na base das criptas, bem como em uma região superior previamente descrita como um nicho comum de diferenciação celular. Nessa área, os níveis de expressão de ambos os genes mostraram-se relativamente uniformes ao longo de todo o trato intestinal. Em contraste, nas regiões superficiais das vilosidades, a expressão foi mais variável, refletindo padrões distintos, embora parcialmente sobrepostos, entre os dois genes. No jejuno e no íleo, GUCA2A e GUCA2B apresentaram expressão abundante nos enterócitos. No entanto, no cólon, apenas o transcrito de GUCA2A foi detectado nas células da superfície epitelial. Já no duodeno, observou-se baixa expressão de GUCA2B nas células colunares, enquanto GUCA2A apresentou expressão restrita exclusivamente às células secretoras.

## 2.5 Gene luciferase

A eficiência de métodos de transfecção, principalmente daquelas baseadas em lipoplexos, é geralmente avaliada por meio da quantificação de proteínas repórteres expressas. Ensaio de luciferase destacam-se por sua alta sensibilidade, rapidez, facilidade de execução e ampla disponibilidade. Como o objetivo principal na indústria biotecnológica é maximizar a produção da proteína de interesse, torna-se relevante utilizar a quantificação da proteína repórter como parâmetro de rendimento (Porosk *et al.*, 2022).

A análise de dados obtidos por meio do ensaio com repórter de luciferase pode ser impactada por diversos fatores, sendo a variabilidade na eficiência de transfecção um dos principais desafios. Essa variação pode ser acentuada em linhagens celulares de difícil transfecção. Além disso, outras fontes de variação experimental, como diferenças na quantidade de DNA introduzido, no número de células utilizadas, na viabilidade celular e na precisão durante a pipetagem, contribuem para a inconsistência dos resultados. Como

consequência, os níveis de luminescência produzidos pela expressão da luciferase podem apresentar variações de até uma ordem de magnitude entre as amostras (Repele; Manu, 2019).

A luciferase, especialmente nas formas Firefly (*Photinus pyralis*) e Renilla (*Renilla reniformis*), é amplamente utilizada em ensaios de dupla-luciferase, onde um gene repórter experimental é co-transfectado com um plasmídeo de controle contendo a luciferase. Este sistema permite a normalização da atividade gênica experimental em relação à expressão do repórter controle, refletindo diretamente a eficiência da transfecção (Jiwaji *et al.*, 2011; Repele; Manu, 2019).

## 2.6 Linhagem celular HEK 293T

A linhagem celular HEK 293, derivada de células embrionárias de rim humano transformadas com adenovírus tipo 5 humano, foi desenvolvida há cerca de 37 anos. No entanto, seu uso se intensificou apenas nos últimos anos, tornando-se uma das linhagens humanas mais utilizadas em pesquisas voltadas à expressão de proteínas recombinantes (Paschoal, 2016; Fu *et al.*, 2024).

A linhagem celular HEK 293T é uma variante da HEK 293 que foi modificada geneticamente e contém o gene do antígeno T do vírus SV40 (Símio vírus 40). Essa linhagem é amplamente empregada na expressão de proteínas recombinantes devido à sua eficiente maquinária bioquímica, que realiza com precisão o processamento pós-traducional necessário para gerar proteínas humanas funcionalmente ativas. Essa linhagem possui um cariótipo hipotriplóide, com 64 cromossomos, e apresenta um tempo de duplicação em torno de 34 horas (Portolano, 2014; Paschoal, 2016; Silva, 2018).

O crescimento da linhagem HEK 293T ocorre em aderência e de maneira rápida, facilitando a produção em maior escala. Além disso, o crescimento dessas células de forma aderente facilita a visualização e a seleção dos clones produtores (Barros, 2019).

### 3 JUSTIFICATIVA

A crescente demanda por terapias eficazes e seguras tem impulsionado o avanço da engenharia genética, especialmente no que diz respeito à produção de proteínas recombinantes humanas. Essa tecnologia é fundamental tanto para o desenvolvimento de medicamentos quanto para o estudo funcional de biomoléculas envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. Nesse contexto, a possibilidade de expressar genes humanos em sistemas de cultivo celular viáveis e eficientes representa um dos pilares para a inovação em biotecnologia (Hahimi *et al.*, 2018; Chong *et al.*, 2021; Cocchiaro *et al.*, 2022).

A escolha da linhagem celular HEK 293T como sistema de expressão para o gene GUCA2A justifica-se por suas características favoráveis à produção de proteínas humanas funcionais. Essa linhagem apresenta tempo de crescimento rápido, facilidade de manipulação genética, elevada eficiência de transfecção e, principalmente, capacidade de realizar modificações pós-traducionais complexas, como a glicosilação e formação de pontes dissulfeto, que são essenciais para a atividade biológica de muitas proteínas humanas (Portolano, 2014; Paschoal, 2016; Silva, 2018).

A guanilina, codificada pelo gene GUCA2A, é um peptídeo fundamental na regulação da homeostase eletrolítica e da integridade da mucosa intestinal, atuando via ativação do receptor guanilato ciclase-C (GC-C). Disfunções nessa via de sinalização estão associadas a diversos distúrbios gastrointestinais, podendo evoluir para o surgimento de tumores (Ershov *et al.*, 2023; Tian *et al.*, 2025). Assim, a obtenção da guanilina por meio de expressão recombinante não só permite o estudo aprofundado de sua função, como também abre caminhos para aplicações terapêuticas inovadoras e desenvolvimento de novos biofármacos.

Diante disso, este trabalho se justifica pela necessidade estabelecer um método eficiente para a inserção do gene GUCA2A em uma linhagem celular de mamíferos, a HEK 293T, e posterior produção e purificação da guanilina recombinante. A padronização de um sistema de expressão utilizando células HEK 293T e técnicas consolidadas de transfecção contribuirá significativamente para pesquisas futuras voltadas à fisiologia intestinal, ao desenvolvimento de terapias baseadas na produção de proteína recombinantes e à criação de modelos experimentais voltados para doenças relacionadas à disfunção do eixo GUCA2A/GC-C.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade da linhagem celular HEK-293T de incorporar o gene GUCA2A através de uma transfecção com DNA plasmidial recombinante.

### 4.2 Objetivos específicos

- Analisar a incorporação do gene GUCA2A nos plasmídeos vetores pVL-eGFP em *Escherichia coli* DH5alpha;
- Selecionar linhagens de *Escherichia coli* DH5alpha resistentes à ampicilina e contendo os plasmídeos recombinantes;
- Isolar e quantificar os plasmídeos vetores pVL-eGFP;
- Transfectar as células HEK-293T com DNA plasmidial recombinante;
- Avaliar a incorporação de gene GUCA2A em células HEK-293T.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Incorporação do DNA heterólogo no vetor plasmidial

O gene GUCA2A foi inserido no plasmídeo pVL-eGFP por meio de um processo de clonagem molecular utilizando as enzimas de restrição BamHI e XbaI, que atuam como ferramentas específicas para cortar o DNA em sequências reconhecidas, possibilitando a abertura do vetor em locais determinados. Esse procedimento permitiu a construção de um DNA plasmidial recombinante capaz de expressar tanto o gene GUCA2A quanto a proteína fluorescente eGFP, facilitando a detecção em células transfectadas.

Após a construção do vetor recombinante, o plasmídeo foi introduzido na bactéria *Escherichia coli* DH5alpha, uma cepa amplamente utilizada em biotecnologia por sua elevada eficiência de transformação e estabilidade genética. O processo de transformação foi realizado com o objetivo de permitir a amplificação do plasmídeo recombinante em larga escala para posterior utilização nos experimentos celulares.

Para verificar se a incorporação do gene GUCA2A no plasmídeo ocorreu corretamente nas bactérias transformadas, foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando amostras de colônias bacterianas geneticamente modificadas como molde. A análise foi conduzida no equipamento QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific), que permite a detecção em tempo real da amplificação dos produtos de DNA.

Para a reação de PCR, foi realizada inicialmente uma etapa de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, com o objeto de separar a dupla fita de DNA. Em seguida, foram realizados 45 ciclos de amplificação, cada um composto por uma fase de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e uma etapa de anelamento/extensão a 65 °C por 1 minuto. Após a amplificação, procedeu-se à análise da curva de dissociação, caracterizada por um aumento gradual da temperatura, à razão de 0,15 °C por segundo, no intervalo de 65 °C a 95 °C.

### 5.2 Crescimento da cepa bacteriana modificada

A bactéria *Escherichia coli*, geneticamente modificada com o plasmídeo vetor pVL-eGFP expressando o gene da GUCA2A e da luciferase foi inoculada em 3 tubos contendo 10 mL de Caldo Luria Bertani (LB) cada, acrescido de 10 % de ampicilina. Esse procedimento também foi realizado com a bactéria *E. coli* geneticamente modificada com o plasmídeo vetor pVL-eGFP expressando apenas o gene da luciferase.

Após a inoculação, as bactérias foram incubadas em estufa bacteriológica a  $37 \pm 2$  °C, sob agitação constante, por um período de 24 horas, a fim de promover seu crescimento. O manuseio das bactérias ocorreu dentro de uma cabine de fluxo laminar e essa etapa do experimento foi realizada em um Laboratório de Nível de Biossegurança 2 (NB2).

### **5.3 Extração do DNA plasmidial recombinante**

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific™). Esse kit utiliza a tecnologia de membrana à base de sílica na forma de uma coluna de centrifugação, não havendo a necessidade de utilização de resinas caras, extrações tóxicas de fenol-clorofórmio ou precipitação com álcool demorada.

No procedimento de extração foram utilizadas 3 amostras de cada. As amostras foram centrifugadas a 4 °C em 6.800 G durante 20 minutos. Após esse período, as células bacterianas foram ressuspensas em 250 µL de solução de ressuspensão e esta foi transferida para um tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 250 µL de solução de lise à suspensão e foi realizada a homogeneização invertendo o tubo de 4 a 6 vezes até que a solução ficasse viscosa e ligeiramente límpida. Ao chegar nesse ponto, foi adicionado 350 µL da solução de neutralização e imediatamente foi realizada a mistura, invertendo o tubo de 4 a 6 vezes. Essa suspensão foi centrifugada a 4 °C em 6.800 G durante 5 minutos, para sedimentar restos celulares e DNA cromossômico. O sobrenadante foi transferido para a coluna de rotação GeneJet, fornecida pelo kit, por pipetagem, evitando perturbar ou transferir o precipitado branco. Centrifugou-se a 4 °C em 6.800 G por 1 minuto, o fluxo foi descartado e a coluna colocada de volta no mesmo tubo coletor. Adicionou-se 500 µL de solução de lavagem na coluna de rotação GeneJet e foi centrifugada a 4 °C em 6.800 G por 1 minuto, descartando novamente o fluxo e a coluna colocada de volta no mesmo tubo de coleta. O procedimento de lavagem foi repetido usando 500 µL de solução de lavagem. Descartou-se o fluxo e foi centrifugado a 4 °C em 6.800 G por mais 1 minuto, para a remoção da solução de lavagem residual. A coluna de rotação GeneJet foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionou-se 30 µL do tampão de eluição (H<sub>2</sub>O) ao centro da membrana para eluir o DNA plasmídico, tendo cuidado para não entrar em contato com a membrana. Foi incubado por 2 minutos à temperatura ambiente e, após esse período, foi centrifugado a 4 °C em 6.800 G durante 2 minutos. Para o plasmídio, o tampão de eluição foi pré-aquecido a 70 °C. Descartou-se a coluna de rotação GeneJet e o DNA plasmidial purificado foi armazenado a -20 °C.

#### **5.4 Quantificação do DNA plasmidial recombinante**

Para quantificar o DNA plasmidial bacteriano foi utilizado o equipamento NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™), um espectrofotômetro de microvolume que mede a absorvância da luz em diferentes comprimentos de onda. Ele é utilizado para medir a concentração e pureza de pequenas quantidades de amostras biológicas como o DNA, RNA e proteínas. O volume da amostra utilizado para a quantificação foi 1 µL.

#### **5.5 Cultivo das células HEK-293T**

As células HEK-293T foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina e estreptomicina (PS), sendo mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, condições ideais para o crescimento e a manutenção da linhagem celular.

Para a realização do repique celular, o meio de cultura foi removido da placa de cultivo, e as células foram lavadas com 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), a fim de eliminar resíduos do meio. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de tripsina-EDTA a 0,05% (Gibco) para promover o desprendimento das células aderidas ao fundo da placa. A placa foi incubada por, aproximadamente, 5 minutos na estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, até que as células se encontrassem completamente desprendidas da placa.

Após a ação da tripsina, a suspensão celular foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 2 mL e submetida à centrifugação a 6000 rpm por 30 segundos, resultando na formação de um pellet celular no fundo do tubo. O pellet obtido foi então lavado com 1 mL de PBS para remover resíduos de tripsina e novamente centrifugado nas mesmas condições. O segundo pellet formado foi ressuspensão em 1 mL do meio de cultura, restabelecendo uma suspensão celular adequada para posterior contagem.

A contagem das células foi realizada em uma câmara de Neubauer, permitindo a determinação da concentração celular. Com base nos resultados, foram semeadas 1x10<sup>6</sup> células HEK 293T em cada uma de duas placas de 10 cm de diâmetro, as quais foram mantidas sob as mesmas condições de cultivo previamente descritas, até que as células atingissem entre 80 e 85% de confluência, ponto ideal para a realização do procedimento de transfecção.

Todo o procedimento foi conduzido em condições estéreis, dentro de uma cabine de fluxo laminar vertical, previamente descontaminada com luz ultravioleta (UV) por 30

minutos, e com todos os materiais e reagentes devidamente esterilizados, garantindo a assepsia e a integridade das culturas celulares durante todas as etapas do experimento.

## **5.6 Transfecção celular**

Para a transfecção das células HEK 293T com o plasmídeo vetor pVL-eGFP, contendo o gene GUCA2A e luciferase, foi diluído 2 µg de plasmídeo em 500 µL de meio DMEM sem FBS e PS em um tubo de microcentrífuga de 2 mL. Em outro tubo foi diluído 20 µL de Escort™ IV Transfection Reagent (Sigma-Aldrich) em 500 µL de meio DMEM sem FBS e PS. Em um outro tubo foram misturadas as soluções e levemente agitadas. Essa mistura ficou em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. Durante esse tempo, as células foram lavadas com meio DMEM sem FBS e PS, adicionando 8 mL desse meio na placa. Ao fim do período de repouso, os 1000 µL da mistura foram adicionados na placa com as células no meio DMEM sem FBS e PS. Foi incubado por 6 horas na estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C. Decorrido esse tempo, o meio sem FBS e PS foi removido e um novo meio DMEM com 10% de FBS e 1% de PS foi adicionado. O mesmo procedimento foi realizado com o plasmídeo vetor contendo apenas o gene da luciferase.

As células, após esse procedimento de transfecção, foram colocadas na estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C por 48 horas para a recuperação. Ao fim desse período, foi feito o repique e adicionou-se gradativamente pequenas concentrações de puromicina para iniciar a seleção das células que assimilaram o plasmídeo.

## **5.7 Tratamento com puromicina**

Inicialmente, as células HEK 293T transfectadas foram submetidas ao tratamento com o antibiótico puromicina, com o objetivo de realizar a seleção positiva das células que incorporaram o plasmídeo recombinante contendo o gene de resistência a esse antibiótico. Para a primeira etapa do ensaio, foi utilizada inicialmente 1 µL de puromicina (Gibco), com concentração de 10 mg/mL, em 10 mL de meio de cultura, o que corresponde a uma concentração final de 0,1 mg/mL.

Antes da adição da puromicina, o meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS foi removido, e as células foram lavadas com 2 mL de PBS, a fim de eliminar resíduos do meio anterior e promover a homogeneização das condições. Em seguida,

foi adicionado 10 mL de DMEM, também suplementado com FBS e PS, já contendo a concentração determinada de puromicina.

A placa foi então incubada por um período de 6 horas em estufa a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, o meio contendo o antibiótico foi descartado, e as células foram novamente lavadas com PBS, com o intuito de remover as células que não sobreviveram à ação da puromicina, além de eliminar restos celulares que poderiam comprometer a recuperação das células viáveis. Em seguida, as células sobreviventes receberam novo meio DMEM com 10% de FBS e 1% de PS, e passaram por um período de recuperação celular e permitir que as células resistentes se estabilizassem metabolicamente após o estresse do tratamento seletivo.

Esse procedimento foi repetido em etapas subsequentes, com o aumento progressivo da concentração de puromicina adicionada ao meio, a fim de avaliar a tolerância e resistência das células transfectadas. As concentrações testadas foram: 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 0,9 mg/mL, permitindo estabelecer uma curva de resposta celular à seleção antibiótica e determinar a concentração ideal para eliminação das células não transfectadas, sem comprometer a viabilidade das células modificadas geneticamente.

## **5.8 Visualização da fluorescência**

As células transfectadas, bem como as células controle não transfectadas, foram transferidas para uma placa de 96 poços, com a distribuição de  $1 \times 10^4$  células por poço. Para a realização dessa transferência, as células em cultivo foram submetidas ao processo de tripsinização, conforme descrito no tópico 5.5, que consiste na utilização da enzima tripsina para desprender as células do suporte de cultura, garantindo uma suspensão celular homogênea e viável para a contagem e semeadura.

Posteriormente, as células foram contadas utilizando uma Câmara de Neubauer, equipamento padrão para a determinação precisa da concentração celular. Com base na contagem obtida, foi preparada uma suspensão celular contendo  $1 \times 10^6$  células em 10 mL de meio de cultura, proporcionando uma concentração adequada para a semeadura em placas de múltiplos poços.

Utilizando uma pipeta multicanal, foram adicionados 100 µL dessa suspensão celular em cada poço da placa, garantindo uma distribuição uniforme das células. As placas foram então incubadas em condições ideais, permitindo que as células aderentes crescessem

até atingir uma confluência aproximada de 80%, ponto considerado adequado para a realização do tratamento experimental.

Quando a confluência desejada foi alcançada, o meio de cultura foi removido e substituído por um novo meio de cultura DMEM contendo 1 mg/mL de puromicina, aplicado somente nas células transfectadas, com o intuito de realizar a seleção das células que incorporaram o plasmídeo com o gene de interesse. A placa foi então incubada por um período de 6 horas em estufa com atmosfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

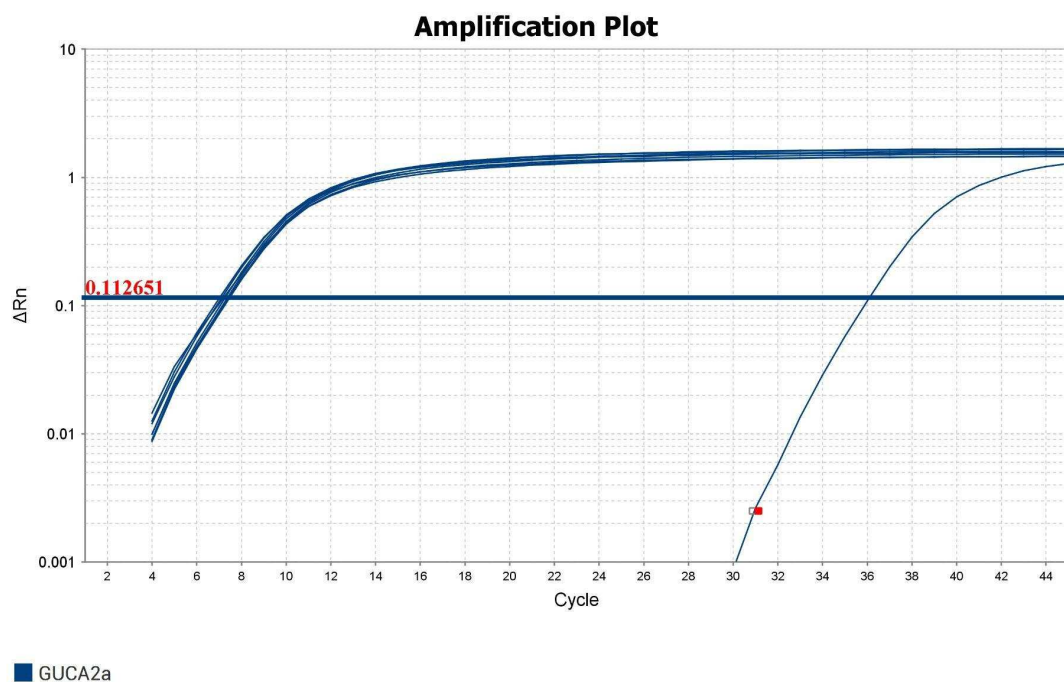
Após o período de incubação com puromicina, a placa foi transferida para o equipamento Agilent BioTek Cytation C10 Confocal Imaging Reader (Thermo Fisher Scientific) para aquisição de imagens e análise. Através do uso do software Gen5 Data Analysis, para a visualização da fluorescência das células transfectadas.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Incorporação do gene GUCA2A no plasmídeo vetor em *E. coli* DH5alpha

A curva de amplificação do gene GUCA2A (Figura 4) apresenta curvas bem agrupadas e com amplificações nos ciclos iniciais, indicando que o gene de interesse está presente nas amostras e foi amplificado com sucesso.

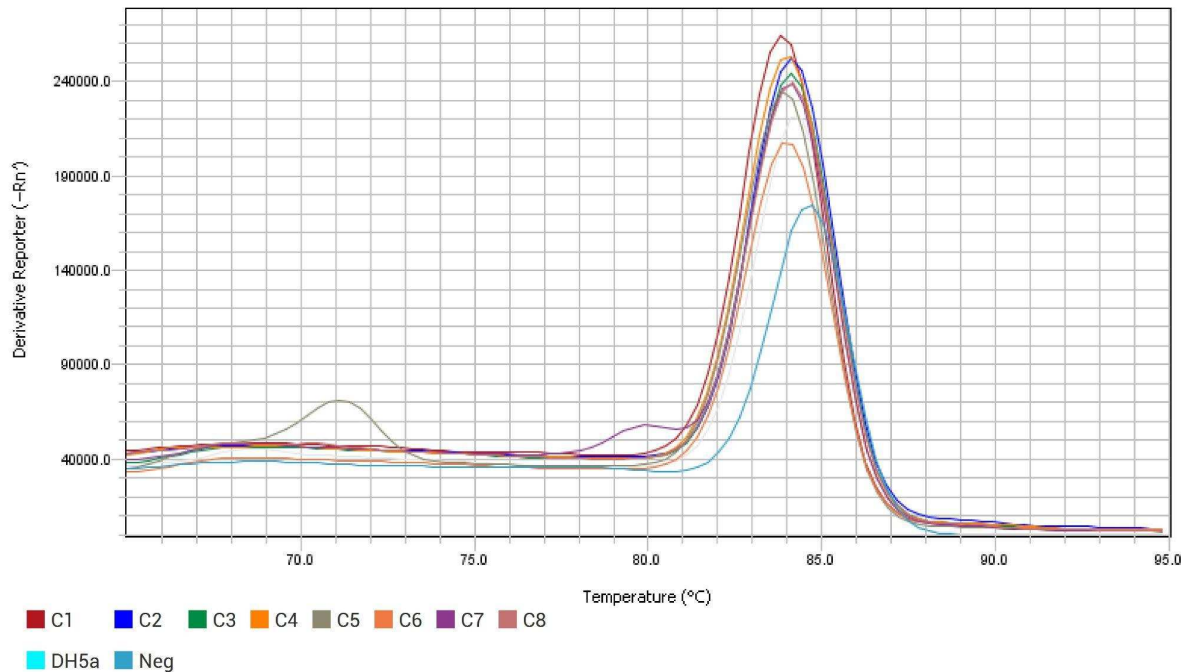
Figura 4 - Curva de amplificação do gene GUCA2A



Curva de amplificação das amostras de cepas bacterianas de *Escherichia coli* DH5alpha contendo o plasmídeo vetor pVL-eGFP recombinante com o gene da GUCA2A. Fonte: Autoral

Analisando as curvas de dissociação (Figura 5), percebe-se a formação de um único pico para 6 das 8 amostras analisadas, indicando a presença de um único produto. O pico da temperatura de dissociação ficou em torno de 84 °C.

**Figura 5 - Curva de dissociação**  
**Melt Curve Plot**



Curva de dissociação das amostras de cepas bacterianas de *Escherichia coli* dH5alpha contendo o plasmídeo vetor pVL-eGFP recombinante com o gene da GUCA2A. Fonte: Autoral

## 6.2 Crescimento da bactéria modificada com o plasmídeo recombinante

Após o período de incubação de 24 horas em estufa bacteriológica, mantida a uma temperatura controlada de  $37 \pm 2$  °C e sob agitação constante, foi observado o crescimento satisfatório da cepa de *Escherichia coli* dHalpha, previamente transformada com o plasmídeo recombinante de interesse. As culturas foram realizadas em meio LB líquido, suplementado com 10 % de ampicilina, que atuou como agente seletivo, garantindo que apenas as bactérias que continham o plasmídeo com o gene de resistência sobrevivessem e se multiplicassem.

O crescimento em todos os tubos indicou que a seleção da cepa bacteriana foi eficiente e que as colônias presentes possuíam o plasmídeo contendo o gene de interesse. Após essa etapa, as amostras bacterianas foram utilizadas como fonte para a extração do DNA plasmidial, que posteriormente foi utilizado em processos de transfecção celular e análise molecular.

### 6.3 Extração do DNA plasmidial recombinante

Após a realização do protocolo de extração do DNA plasmidial recombinante, utilizando o kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific™), foi possível isolar o material genético a partir das culturas bacterianas de *E. coli* DH5alpha resistentes à ampicilina previamente selecionadas. Esse kit baseia-se em um processo de purificação por colunas de sílica, permitindo a obtenção de DNA plasmidial de alta pureza e adequado para aplicações posteriores, como transfecção celular e PCR.

Como resultado, foram obtidas três amostras de 30 µL contendo suspensões de DNA plasmidial recombinante codificante tanto para o gene GUCA2A quanto para o gene da luciferase, utilizados em co-transfecção. Adicionalmente, foram obtidas amostras da mesma quantidade contendo apenas o DNA plasmidial codificante do gene da luciferase, que servirá como controle para análise da expressão gênica. A concentração e integridade do DNA extraído foram verificadas por espectrofotometria e, posteriormente, essas amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até sua utilização nas etapas seguintes dos experimentos.

### 6.4 Quantificação do DNA plasmidial recombinante

Os resultados obtidos na quantificação utilizando o equipamento NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™) estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1 - Resultados da quantificação do DNA plasmidial**

Gene	Concentração (ng/µL)	A280/A260
GUCA2A / LUCIFERASE	103,4	2,06
GUCA2A / LUCIFERASE	72,6	2,08
GUCA2A / LUCIFERASE	67,5	2,11
LUCIFERASE	119,1	2,12
LUCIFERASE	65,5	2,01
LUCIFERASE	107,8	2,12

Fonte: Autoral

Para a realização da etapa de transfecção das células HEK 293T, optou-se por utilizar as amostras que apresentaram as maiores concentrações de DNA plasmidial obtidas, conforme demonstrado na Tabela 1. Essa escolha visou garantir uma maior eficiência na introdução do material genético nas células, uma vez que concentrações mais elevadas de plasmídeo tendem a favorecer a captação do DNA e, conseqüentemente, a expressão dos genes de interesse. Assim, foram selecionadas as amostras com concentrações de 103,4 ng/ $\mu$ L para o plasmídeo contendo o gene GUCA2A e 119,1 ng/ $\mu$ L para o plasmídeo contendo o gene da luciferase. Essas amostras foram utilizadas para compor a mistura de transfecção, sendo utilizadas em co-transfecção para promover, simultaneamente, a expressão do gene GUCA2A e a quantificação indireta dessa expressão por meio da atividade da luciferase. A padronização das quantidades foi realizada com base na concentração e no volume disponível, respeitando os limites recomendados pelo protocolo do reagente de transfecção utilizado.

### **6.5 Transfecção celular e tratamento com puromicina**

Após a realização do procedimento de transfecção, as células HEK293T foram mantidas em incubação por um período de recuperação, com o objetivo de permitir sua estabilização e a expressão inicial dos genes introduzidos, antes do início da seleção com o antibiótico. Esse intervalo é essencial para que as células transfectadas com sucesso possam iniciar a produção das proteínas de resistência à puromicina, garantindo sua sobrevivência nos tratamentos subsequentes.

Em seguida, foi iniciado o tratamento seletivo com puromicina, um antibiótico amplamente utilizado para eliminar células que não incorporaram o plasmídeo contendo o gene de resistência. Na primeira etapa, utilizou-se a menor concentração testada, de 0,1 mg/mL de meio de cultura, a qual resultou em uma baixa taxa de mortalidade celular, indicando que essa concentração não foi suficientemente efetiva para selecionar apenas as células transfectadas.

Conforme as concentrações de puromicina foram sendo aumentadas, observou-se uma elevação progressiva na mortalidade celular, o que evidencia a ação seletiva do antibiótico, eliminando as células que não expressavam o gene de resistência presente no plasmídeo. Esse processo permitiu identificar a concentração mais eficaz para a seleção positiva das células transfectadas.

Nas Figuras 6 e 7, são apresentadas imagens obtidas por microscopia óptica das células HEK293T após o último tratamento com puromicina, utilizando a concentração mais

elevada testada, de 0,9 mg/mL. A Figura 4 mostra as células transfectadas exclusivamente com o gene da luciferase, enquanto a Figura 5 apresenta as células co-transfectadas com os genes GUCA2A e luciferase, permitindo a comparação dos efeitos do tratamento seletivo em diferentes condições experimentais.

**Figura 6 - Células HEK 293T transfectadas com gene da Luciferase**

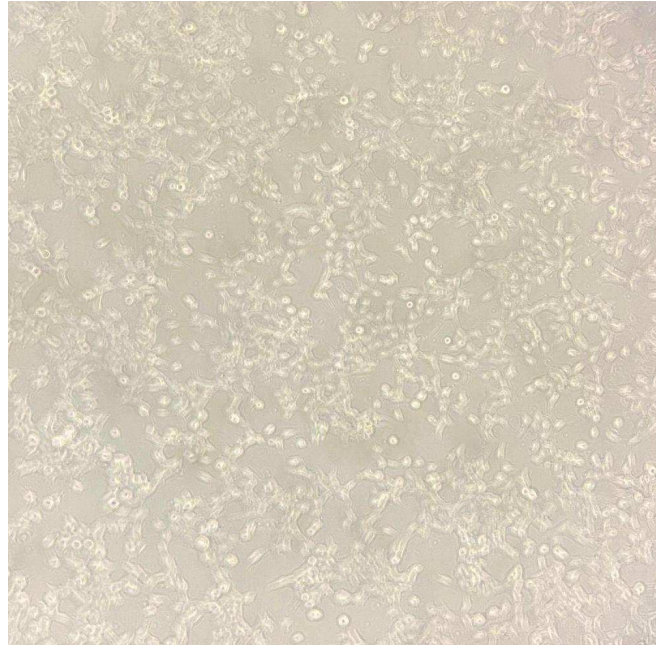


Imagem visualizada em microscópio com aumento de 10x. Fonte: Autoral

**Figura 7 - Células HEK 293T transfectadas com o gene da GUCA2A e Luciferase**



Imagem visualizada em microscópio com aumento de 10x. Fonte: Autoral

## 6.6 Fluorescência celular

A análise da placa de 96 poços foi realizada por meio do equipamento Agilent BioTek Cytation C10 Confocal Imaging Reader (Thermo Fisher Scientific), utilizando o software Gen5 Data Analysis para aquisição e processamento das imagens. Este sistema multimodal possibilita a captura de imagens de alta resolução por fluorescência, além de oferecer recursos avançados de foco automático, ajuste de exposição e seleção precisa dos comprimentos de onda específicos para cada fluoróforo.

Durante a leitura, foi possível identificar a presença de fluorescência verde intensa nas células transfectadas com o plasmídeo vetor pVL-eGFP, o qual codifica a proteína eGFP, como mostrado na Figura 8. A fluorescência observada indica que a transfecção foi satisfatória, permitindo a expressão da proteína fluorescente no interior das células HEK 293T.

A emissão do sinal verde fluorescente foi detectada no canal correspondente à eGFP, com as células exibindo uma coloração brilhante e bem distribuída, característica da expressão do marcador. Esse resultado confirma não apenas a captação do plasmídeo pelas células, mas também a integridade funcional do vetor e a eficiência do protocolo de transfecção empregado.

**Figura 8 - Fluorescência das células HEK 293T transfectada com o gene GUCA2A**

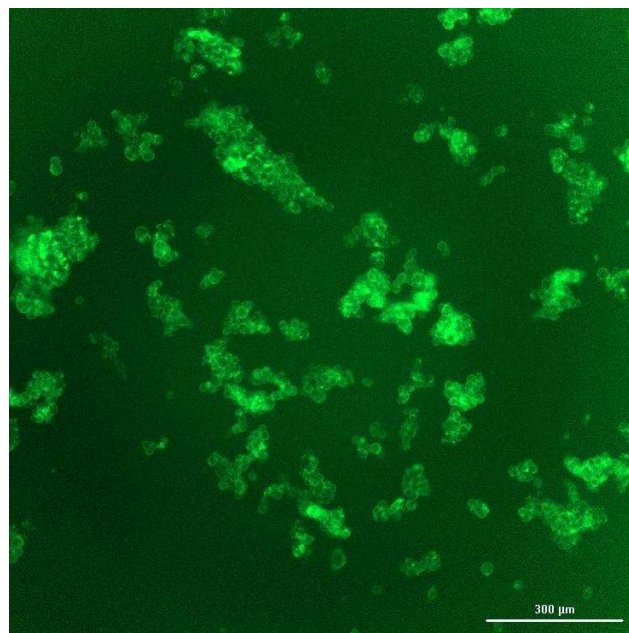


Imagem obtida no equipamento Agilent BioTek Cytation C10 Confocal Imaging Reader (Thermo Fisher Scientific) emitindo a fluorescência. Fonte: Autoral.

**Figura 9 - Célula HEK 293T transfectada com o gene GUCA2A sem fluorescência**

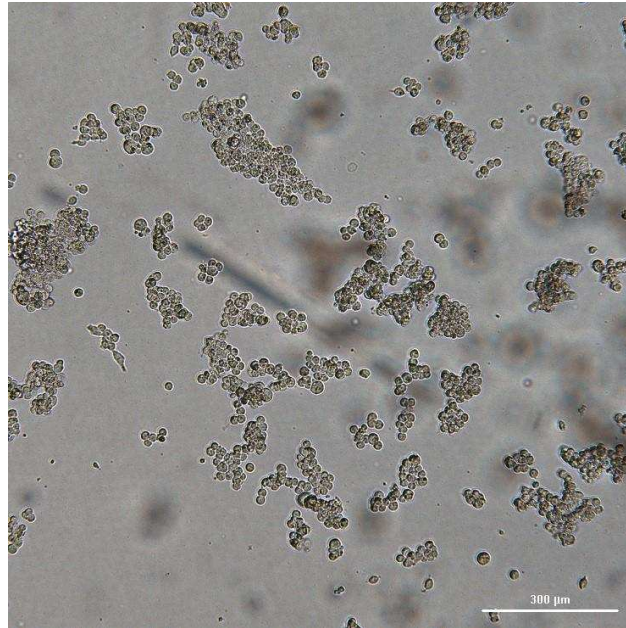


Imagem obtida no equipamento Agilent BioTek Cytation C10 Confocal Imaging Reader (Thermo Fisher Scientific) sem a emissão da fluorescência. Fonte: Autoral.

As células HEK 293T controle foram visualizadas no mesmo equipamento, sob as mesmas condições, mas não foi visualizada a fluorescência nelas.

**Figura 10 - Células HEK 293T controle não fluorescentes**

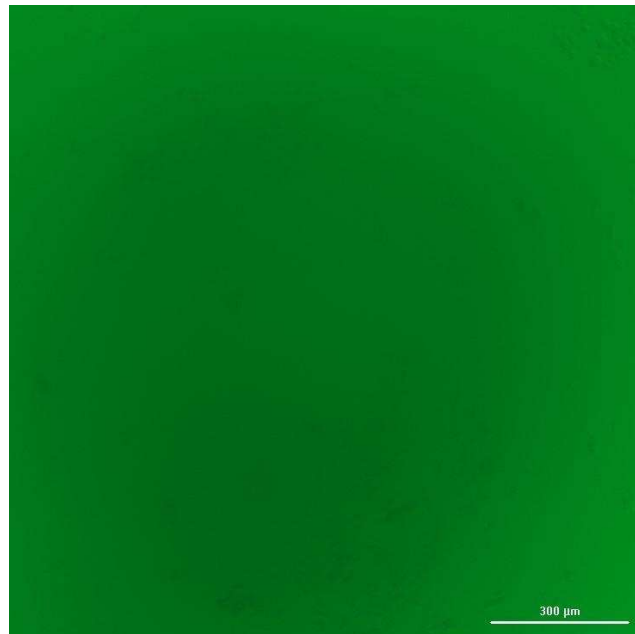


Imagem obtida no equipamento Agilent BioTek Cytation C10 Confocal Imaging Reader (Thermo Fisher Scientific) com emissão da fluorescência. Fonte: Autoral.

**Figura 11 - Células HEK 293T controle**

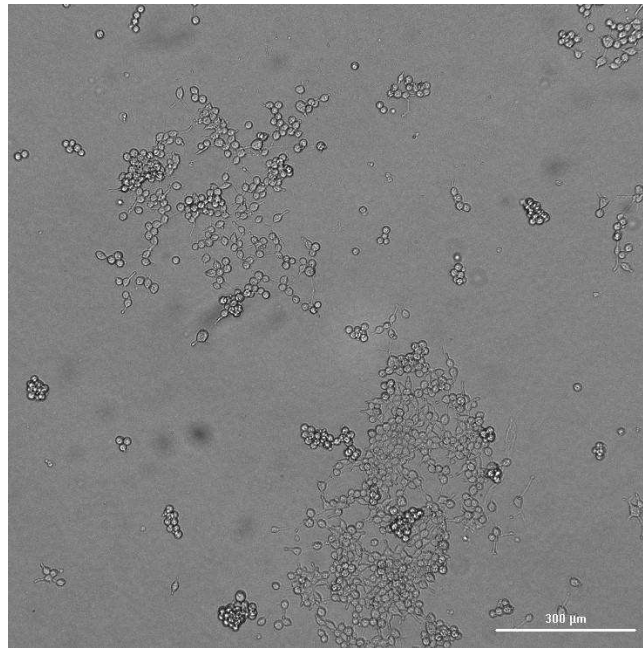


Imagem obtida no equipamento Agilent BioTek Cytation C10 Confocal Imaging Reader (Thermo Fisher Scientific) sem a emissão da fluorescência. Fonte: Autoral.

## 6.7 Análises de dados

Os dados obtidos foram analisados de forma descritiva, com base na observação e comparação dos resultados obtidos nos diferentes grupos experimentais. Os registros de fluorescência e os resultados da seleção por puromicina foram avaliados de maneira qualitativa e comparativa, considerando a presença, ausência ou intensidade dos sinais observados.

As imagens de fluorescência foram utilizadas para verificar a expressão do gene *GUCA2A* por meio do marcador eGFP, enquanto os resultados obtidos por PCR foram analisados com base na amplificação das amostras, comparando os grupos transfectados com os controles negativos.

## 7 DISCUSSÃO

A produção de proteínas recombinantes utilizando células eucarióticas é uma estratégia amplamente empregada para a obtenção de biomoléculas com propriedades funcionais próximas às encontradas *in vivo*. Os resultados obtidos ao longo do trabalho demonstraram que as metodologias empregadas, incluindo a incorporação do gene de interesse no plasmídeo vetor, o crescimento bacteriano, a extração e quantificação de DNA plasmidial, a transfecção e a seleção celular, foram eficazes na construção de um sistema funcional para expressão gênica.

A análise da curva de amplificação obtida por PCR em tempo real (Figura 3) demonstrou que o gene GUCA2A foi amplificado de forma eficiente, com curvas bem definidas e agrupadas nos ciclos iniciais da reação. Esse padrão de amplificação indica não apenas a presença do gene de interesse nas amostras analisadas, mas também uma boa concentração e qualidade do DNA molde, refletindo a eficiência dos procedimentos anteriores de extração, purificação e preparo da amostra.

A curva de dissociação (Figura 4), utilizada para avaliar a especificidade dos produtos amplificados, revelou a formação de um único pico bem definido para a maioria das amostras, com uma temperatura média de dissociação de aproximadamente 84 °C. A presença de um único pico sugere que a reação de PCR foi altamente específica, sem formação de dímeros de primers ou amplificação de produtos inespecíficos.

Esses resultados, em conjunto, confirmam que a amplificação ocorreu de maneira direcionada e eficiente, validando a presença do gene GUCA2A inserido no plasmídeo recombinante, que foi previamente introduzido na cepa de *Escherichia coli* dHalpha. O sucesso dessa amplificação serve como validação da incorporação correta do DNA heterólogo ao vetor, visto que o gene GUCA2A, responsável por codificar a guanilina, está expresso em células intestinais humanas (Brenna *et al.*, 2015; Ershov *et al.*, 2023; Tian *et al.*, 2025), e, a presença desse gene em amostras bacterianas, indica que a construção do vetor plasmidial recombinante foi eficiente e conseguiu expressar o gene de interesse.

O crescimento da bactéria *Escherichia coli* dH5alpha em meio LB com 10 % de ampicilina indica que ocorreu a seleção das cepas resistentes à ampicilina contendo o plasmídeo vetor. A presença do gene de resistência à ampicilina no vetor permite que apenas as colônias transformadas cresçam, tendo, assim, um sistema de seleção eficiente (Tsang, 2017). A extração dos plasmídeos dessas colônias, seguida pela quantificação via

espectrofotometria, forneceu amostras com concentrações adequadas, garantindo um bom rendimento para a transfecção celular.

A linhagem celular HEK 293T foi escolhida por sua eficiência nos processos de transfecção, sendo utilizada para expressão de proteínas complexas que não conseguem ser expressas por organismos procariontes. Essas células possuem uma elevada taxa de proliferação, além de conterem o gene SV40 T-antígeno, que promove a replicação de plasmídeos contendo a origem SV40, aumentando assim a expressão gênica transiente. (Paschoal, 2016; Fu *et al.*, 2024). A transfecção por lipofecção, seguida do período de recuperação celular, permitiu que o DNA plasmidial fosse internalizado, transcrito e potencialmente traduzido pelas células hospedeiras.

A puromicina é um antibiótico utilizado para seleção de células mamíferas transfectadas, por conta da sua ação inibitória da síntese protéica, causando a morte das células que não expressam o gene de resistência incluído no vetor, mesmo que em baixas concentrações (Hong *et al.*, 2014; Silveira, 2016). A resposta progressiva ao aumento da concentração de puromicina mostra uma correlação entre a dose aplicada e o nível de morte celular, em que apenas as células transfectadas sobreviveram às concentrações mais elevadas de puromicina, de até 0,9 mg/mL. Este comportamento indica que a seleção das células transfectadas foi eficiente, permitindo o crescimento das células que mantiveram e expressaram o plasmídeo recombinante.

As imagens microscópicas obtidas das células HEK 293T transfectadas com os genes GUCA2A e luciferase evidenciaram a presença de células viáveis mesmo após o último tratamento com a concentração de 0,9  $\mu$ L/mL de puromicina, indicando que a transfecção e a seleção dessas células foi eficiente. A luciferase, utilizada como gene controle, serviu como parâmetro para comparar a eficiência da expressão do gene alvo e validar as condições experimentais (Porosk *et al.*, 2022).

Além das imagens microscópicas obtidas, as imagens obtidas pelo Agilent BioTek Cytation C10 Confocal Imaging Reader (Thermo Fisher Scientific) mostraram a fluorescência das células transfectadas. O plasmídeo vetor pVL-eGFP apresenta em sua estrutura a expressão de uma versão melhorada da proteína fluorescente verde (GFP), a EGFP. A GFP emite luminescência pela transmissão dos prótons presentes nos cromóforos em um determinado comprimento de onda. A EGFP faz parte de uma classe da GFP que possui um ânion fenolato no cromóforo, combinando alto brilho com excitação de luz e emissão simples. Isso confirma a incorporação do DNA plasmidial pela célula, visto que nas células em que a transfecção não foi realizada, não ocorreu a fluorescência (Cavalcante, 2017; Jesuíno, 2020).

A escolha do gene *GUCA2A* como alvo do estudo ocorreu pelo seu importante papel na modulação do sistema guanilato ciclase-c (GC-C). A proteína codificada por esse gene, conhecida como guanilina, participa da regulação da reabsorção de íons e água no epitélio intestinal, tendo implicações tanto em doenças intestinais, como diarreia, constipação e desenvolvimento de tumores, quanto em outros sistemas, como no funcionamento dos rins e hipertensão arterial (Brenna *et al.*, 2015; Ershov *et al.*, 2023; Jalali *et al.*, 2024). A obtenção da expressão recombinante dessa proteína pode, portanto, abrir caminhos para estudos estruturais, funcionais e farmacológicos, bem como para a produção em larga escala de versões recombinantes com finalidades terapêuticas, visto que o fármaco linaclotida, que mostrou-se eficiente para o tratamento de constipação crônica e constipação associada à síndrome do intestino irritável, foi desenvolvido com base na estrutura da guanilina, uroguanilina e enterotoxina termoestável de *Escherichia coli*. (Lima; Fontele, 2014).

O presente trabalho não realizou técnicas de diagnóstico molecular para uma validação mais completa do sistema de expressão. Para isso, seriam necessárias análises complementares, como a Reação de Cadeia em Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR), para quantificação do mRNA do gene *GUCA2A*, indicando se está sendo transcrito adequadamente nas células HEK 293T transfectadas; Western Blot ou imunofluorescência, para detectar a presença da proteína codificada pelo gene *GUCA2A* e avaliar sua localização celular; ELISA ou ensaios funcionais, para verificar a atividade biológica da proteína expressa. Essas etapas adicionais, embora não incluídas neste trabalho, são fundamentais para a caracterização completa da expressão recombinante e devem ser consideradas em estudos futuros.

Desse modo, os dados obtidos demonstram que o protocolo utilizado foi eficaz para a transfecção com o plasmídeo vetor contendo o gene *GUCA2A* em células HEK 293T, podendo ser utilizado como base para trabalhos posteriores de expressão proteica e purificação da guanilina. A confirmação da presença do gene por PCR, associada à viabilidade celular após seleção antibiótica, indica que as células possuem o material genético necessário para produzir a proteína recombinante.

## 8 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a construção de um sistema experimental voltado para a expressão do gene *GUCA2A* em células HEK 293T, visando a obtenção de proteína recombinante funcional. Através da aplicação de técnicas de biologia molecular e celular, foi possível realizar a clonagem do gene *GUCA2A* no plasmídeo pVL-eGFP, seguido de sua amplificação em cepas de *Escherichia coli* DH5alpha, extração e quantificação do DNA plasmidial, além da transfecção das células HEK 293T e seleção das células modificadas por meio do antibiótico puromicina.

Os resultados obtidos ao longo do experimento confirmaram a eficácia do protocolo desenvolvido. A análise por PCR e curva de dissociação demonstrou a correta inserção do gene *GUCA2A* no vetor plasmidial e sua amplificação específica. A eficiência da transfecção foi analisada pela visualização da fluorescência das células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo contendo a proteína eGFP, indicando que as células HEK 293T foram capazes de internalizar o DNA plasmidial e, potencialmente, expressar o gene de interesse, o *GUCA2A*.

Apesar das limitações do estudo, que não incluiu análises funcionais ou proteômicas mais aprofundadas, como Western Blot ou ELISA, o protocolo desenvolvido demonstrou ser viável e eficiente para a etapa inicial de expressão gênica. Futuramente, a implementação dessas técnicas permitirá uma caracterização completa da expressão e funcionalidade da proteína *GUCA2A* recombinante.

Portanto, o presente estudo estabelece as bases para projetos futuros que envolvam a produção e análise funcional da proteína guanilina, abrindo perspectivas para aplicações em pesquisas sobre fisiologia intestinal, desenvolvimento de novos fármacos ou produção industrial de proteínas recombinantes.

## REFERÊNCIAS

- BARROS, Tácita Borges. **Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1 geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero.** 2019. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.
- BRENNAN, Oysten. *et al.* **The guanylate cyclase-C signaling pathway is down-regulated in inflammatory bowel disease.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 50, n. 10, p. 1241–1252, 2015. DOI:10.3109/00365521.2015.1038849.
- CAVALCANTE, Rafael Bezerra. **Construção de linhagem recombinante de *Enterococcus gallinarum* para expressão da proteína Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP).** 2017. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- CHONG, Z. X.; YEAP, S. K.; HO, W. Y. **Transfection types, methods and strategies: a technical review.** *PeerJ*, [S. l.], v. 9, e11165, 21 abr. 2021. DOI: 10.7717/peerj.11165.
- COCCHIARARO, I. *et al.* **Back to basics: Optimization of DNA and RNA transfer in muscle cells using recent transfection reagents.** *Experimental Cell Research*, v. 421, n. 2, p. 113392, 2022. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113392.
- DEWAN, I.; UECKER, H. **A mathematician's guide to plasmids: an introduction to plasmid biology for modellers.** *Microbiology*, [S.l.], v. 169, n. 7, p. 001362, 2023. DOI: 10.1099/mic.0.001362.
- ERSHOV, D. *et al.* **GUCA2A dysregulation as a promising biomarker for accurate diagnosis and prognosis of colorectal cancer.** *Frontiers in Oncology*, 2023. DOI: 10.1007/s10238-024-01512-y.
- FU, Y. *et al.* **Improvement strategies for transient gene expression in mammalian cells.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 108, p. 480, 2024. DOI: 10.1007/s00253-024-13315-y.
- GUIMARÃES, Judith Maria de Oliveira. **Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana para aplicação em transfecção celular.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.
- HONG, W; ZENG, J; XIE, J. **Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs.** *Acta Pharmaceutica Sinica B*, [S.l.], v. 4, n. 4, p. 258-265, 2014. ISSN 2211-3835. DOI: 10.1016/j.apsb.2014.06.012.
- IKPA, P. T. *et al.* **Guanylin and uroguanylin are produced by mouse intestinal epithelial cells of columnar and secretory lineage.** *Histochemistry and Cell Biology*, v. 146, n. 4, p. 445–455, 2016. DOI: 10.1007/s00418-016-1453-4.

JALALI, P. *et al.* **GUCA2A dysregulation as a promising biomarker for accurate diagnosis and prognosis of colorectal cancer.** *Clinical and Experimental Medicine*, [S.l.], v. 24, p. 251, 2024. DOI: 10.1007/s10238-024-01512-y.

JESUÍNO, Aylime Castanho Bolognesi Melchior. **Diferentes estratégias de cultivo de *Escherichia coli* recombinante para produção de proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Proteína - GFP).** 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2020.

JIWAJI, M. *et al.* **The *Renilla* luciferase gene as a reference gene for normalization of gene expression in transiently transfected cells.** *BMC Molecular Biology*, [S.l.], v. 11, p. 103, 2010. DOI: 10.1186/1471-2199-11-103.

LIMA, A. A.; FONTELES, M. C. **From *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous guanylin hormones.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 47, n. 3, p. 179-191, fev. 2014.

NSAIRAT, H. *et al.* **Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications.** *Heliyon*, [S. l.], v.8, n.5, e09394, 13 maio 2022. DOI:10.1016/j.heliyon.2022.e09394.

PASCHOAL, Juliana Fontes Beltran. **Expressão gênica empregando pseudopartículas em células de mamíferos (HEK 293T e Huh 7.0) cultivadas em diferentes meios de cultura livres de soro.** 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

POROSK, L. *et al.* **Predicting Transiently Expressed Protein Yields: Comparison of Transfection Methods in CHO and HEK293.** *Pharmaceutics*, [S.l.], v. 14, n. 9, p. 1949, 2022. DOI:10.3390/pharmaceutics14091949.

PORTOLANO, N. *et al.* **Recombinant protein expression for structural biology in HEK 293F suspension cells: a novel and accessible approach.** *Journal of Visualized Experiments*, n. 92, e51897, 16 out. 2014. DOI: 10.3791/51897.

QUEIROZ, Cid Oliveira de. **Expressão da proteína E2 recombinante do vírus *Chikungunya* em células eucariotas para utilização em plataformas diagnósticas.** 2023. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.

RAHIMI, P. *et al.* **Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents.** *Bratislava Medical Journal*, v. 119, n. 11, p. 701–705, 2018. DOI:10.4149/BLL\_2018\_125.

RAMAMOORTHY, M.; NARVEKAR, A. **Non viral vectors in gene therapy – an overview.** *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, n. 1, p. GE01–GE06, 2015. DOI: 10.7860/JCDR/2015/10443.5394.

REIS, Júlia de Souza. **Estratégias para produção de proteínas recombinantes em células eucariontes e suas aplicações para o diagnóstico de arboviroses.** 2024. Dissertação

(Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2024.

REPELE, A.; MANU. **Robust Normalization of Luciferase Reporter Data**. *Methods and Protocols*, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 62, 2019. DOI10.3390/mps2030062.

SILVA, Felipe Douglas. **Estudo dos perfis de N-glicosilação da prolactina recombinante humana expressa em células humanas HEK293**. 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

SILVEIRA, Marina Bonfogo da. **Pequenos RNAs não decodificadores e sua relação com moléculas de adesão e migração celular em células de carcinoma pulmonar humano**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2016.

TAN, E. *et al.* **HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, 796991, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.796991.

TIAN, B. *et al.* **Epigenetic insights into necrotizing enterocolitis: unraveling methylation-regulated biomarkers**. *Inflammation*, v. 48, n. 1, p. 236–253, 2025. DOI: 10.1007/s10753-024-02054-x.

TSANG, J. **Bacterial plasmid addiction systems and their implications for antibiotic drug development**. *Postdoc Journal*, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 3–9, 2017.