

Tatiana Maria de Souza Moreira

**EFEROCITOSE E RESPOSTA IMUNE CELULAR NA INFECÇÃO
PELO ZIKA VÍRUS**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Araraquara

Supervisora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de
Medeiros

CAPES – 88887.892013/2023-00

Araraquara

2024

INTRODUÇÃO

A infecção por ZIKV provoca intensa morte celular por apoptose em células-tronco humanas precursoras de células neurais, e a indução de apoptose nessas células parece ser dependente da ativação do receptor Toll-like-3 (TLR3) e caspase-3 [1,2]. Esses achados indicam que o ZIKV é altamente neurotrópico e atinge o sistema nervoso central após a infecção, o que implica que o vírus pode ser prejudicial, tanto no adulto, quanto durante o desenvolvimento cérebro nos fetos [3].

A fagocitose de corpos apoptóticos, processo denominado eferocitose, é realizada tanto por fagócitos profissionais, como os macrófagos e células dendríticas (DCs), como por fagócitos não profissionais, como as células epiteliais [4]. A remoção de corpos apoptóticos é fundamental para manutenção da homeostase nos diferentes órgãos, e esse processo ocorre em diferentes etapas, sendo essas denominadas “find me”, “eat me” e “digest-me”. A interação via receptores eferocíticos, bem como a degradação dos corpos apoptóticos estéreis, etapa denominada “digest-me”, leva à diferenciação de fagócitos em um perfil tolerogênico ou anti-inflamatório, reduzindo a expressão de moléculas ativadoras e promovendo a produção de mediadores anti-inflamatórios [5]. Esse ambiente tolerogênico permite a manutenção da homeostase tecidual, e promove um microambiente favorável para diferenciação de linfócitos T reguladores, prevenindo o desenvolvimento de doenças autoimunes [6].

Por outro lado, durante o processo infeccioso, as células teciduais acometidas pela infecção de vírus ou bactérias entram em processo de morte celular, e DCs e macrófagos removem esse corpo apoptótico, contendo o patógeno no seu interior. Durante o processo de degradação do corpo apoptótico, as DCs podem apresentar peptídeos, via MHC-II, oriundos tanto do patógeno, quanto de peptídeos próprios, provenientes das células apoptóticas infectadas [7,8]. Além disso, o perfil imunogênico dessas DCs, tornam-as hábeis em migrar para o linfonodo e induzir a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em diferentes subpopulações de células T helper [9]. A apresentação desses peptídeos próprios por DCs, mediante a eferocitose de células apoptóticas, torna essas células permissivas em induzir a ativação de clones autorreativos e, aumenta as chances de desencadear uma doença autoimune [10].

Os ensaios funcionais de validação de ativação de linfócitos durante o processo de eferocitose de células apoptóticas necessitam do reconhecimento de peptídeos específicos, utilizando ensaios de co-cultura de DC e linfócitos TCD4⁺ naive. Um dos protocolos mais utilizados para o reconhecimento de peptídeos específicos é através da expressão de proteínas heterólogas ao organismo humano, cuja sequência seja expressa constitutivamente na célula, mimetizando a expressão de um antígeno próprio. A ovalbumina (OVA) é a proteína mais abundante na clara no ovo e tem sido amplamente utilizada em pesquisas como um modelo de antígeno para estudos de imunização e vacinação [11-13].

Nesse modelo experimental, utiliza-se linfócitos T isolados de animais OT-I ou OT-II, que possuem o TCR transgênico, para o reconhecimento de peptídeos de OVA. Inúmeros estudos comprovam a eficácia do sistema de infecção por lentivírus para expressão constitutiva de OVA por fagócitos, permitindo a apresentação desse peptídeo via MHC II e a ativação de TCD4+ [14-16].

Para que a célula de mamífero em cultura expresse permanentemente a sequência codificante da proteína heteróloga, é necessário que a sequência nucleotídica seja inserida no DNA genômico, sob controle de um promotor reconhecido pela hospedeira. Para isso, pode ser usado um sistema com vetor viral, tendo como exemplo o sistema de lentivírus [17]. Os lentivírus são vírus envelopados da família Retroviridae que possuem como material genético duas fitas positivas de RNA e carregam uma transcriptase reversa, a fim de transcrever o molde de RNA em DNA complementar [18,19]. Após a síntese da fita dupla de DNA, essa é integrada ao genoma da célula infectada, que passa então a codificar as proteínas virais e a sintetizar novas fitas de RNA genômico viral para a formação de novas partículas [20].

Com a evolução da ciência, foi possível desenvolver novas tecnologias, em que partículas semelhantes à de lentivírus são utilizadas como um vetor de transferência genética, podendo fazer com que uma sequência codificadora de interesse seja integrada ao genoma de uma célula hospedeira, processo que é chamado de transdução [20]. O lentivírus recombinante é comumente utilizado para a transferência de genes, devido à sua característica de pantropismo, ou seja, tem afinidade por receptores de diferentes células. A integração da sequência de interesse ao genoma da célula hospedeira proporciona uma expressão permanente [20].

A partícula de lentivírus deve ser montada em uma célula hospedeira a partir de, pelo menos, dois plasmídeos: um que contém a codificação do gene de envelope e outro codificando elementos essenciais. Para a montagem da partícula viral, inclui-se o plasmídeo de transferência lentiviral, que codifica a proteína de interesse e elementos para transcrição. Essa sequência entre os elementos será transcrita no RNA genômico a ser empacotado na partícula viral a se formar [21]. Portanto, esses plasmídeos devem ser transfectados para dentro de uma célula que permita a fácil incorporação dos plasmídeos a partir do meio externo, e que possibilite a montagem das partículas. Posteriormente, a transdução das partículas virais coletadas é feita para a linhagem de células em estudo.

Assim, o estabelecimento de um protocolo de expressão permanente de OVA em linhagens celulares permite o estabelecimento protocolos experimentais “in vitro”, que visem avaliar a ativação de clones autorreativos durante a eferocitose de células neuronais infectadas com ZIKV, ou nos diferentes modelos experimentais de infecção e câncer em projetos nosso grupo de pesquisa.

Desta forma, o presente relatório descreve a obtenção do DNA recombinante contendo a sequência codificadora de OVA, reagente fundamental para a modificação genética das células de

neuroblastoma e avaliação da autorreatividade devida à infecção por ZIKV. Devido a alguns problemas técnicos, a eficiência da transfecção e a transdução das células não foram finalizadas até o final deste projeto, mas com o reagente gerado pela respectiva pós-doutoranda, outros membros do grupo seguirão com as demais etapas necessárias para avaliar a autoimunidade.

OBJETIVOS

Devido à necessidade de geração do DNA recombinante contendo a sequência codificadora de OVA, os objetivos deste trabalho foram reformulados para sua adequada execução. Portanto, o objetivo deste trabalho foi obter o DNA recombinante de OVA para formação da partícula de lentivírus carregando essa sequência com a finalidade de gerar, posteriormente, uma linhagem celular de neuroblastoma com expressão permanente de ovoalbumina. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- Extração do material genético contendo a sequência molde de OVA;
- Amplificação da sequência codificadora de OVA por reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Clonagem em vetor de transferência de lentivírus e confirmação;
- Preparo dos vetores de formação da partícula de lentivírus;
- Preparo das células de rim de embrião humano (HEK-293) e transfecção.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Extração do DNA molde com a sequência de OVA

A sequência codificadora de OVA foi obtida a partir de células de melanoma B16 geneticamente modificadas, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes da Universidade de São Paulo. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM-F12 (Lonza) com 10% de soro bovino fetal (FBS; Sigma-Aldrich) e 0,1% de antibiótico gentamicina (Gibco). Para extração do material genético, as células foram coletadas por tripsinização (50% de tripsina em RPMI sem soro, Gibco) após confluência. Foi utilizado o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), seguindo o protocolo do fabricante sem alterações. A qualidade do material extraído foi averiguada por espectrofotometria (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) e por eletroforese em gel de 0,8% de agarose em tampão Tris pH 8,0-EDTA-ácido acético (TAE), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

2. Amplificação da OVA

O material genético extraído foi utilizado como molde na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da sequência codificadora de OVA e da sua forma truncada (tOVA). A reação foi realizada pela adição dos seguintes reagentes: 4 µL de Tampão 5X, 0,4 µL de dNTPs (10 mM, New England Biolabs), 2 µL do DNA genômico extraído, 0,2 µL da enzima Phusion DNA polimerase (New England Biolabs) e 1 µL de cada primer. As condições da PCR foram: 98 °C

por 30 s de “hot start”, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento de 55 °C por 10 s e polimerização a 72 °C por 90 s, com um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 min. A sequência do primer forward para amplificação da sequência completa foi 5’-GCTCTAGAATGGGCTCCATCGGTGCAG-3’ e para a amplificação da forma truncada foi 5’-GCTCTAGAATGAGCACCAGGACACAAATAAATAAGGTTG-3’. A sequência do primer reverso foi a mesma para as duas construções: 5’-CGGGATCCAGGGGAAACACATCTGCCAAAAGAAG-3’. As bases sublinhadas são referentes aos sítios de restrição das enzimas utilizadas na digestão para a clonagem do DNA recombinante. Os produtos de PCR foram posteriormente checados em gel de agarose.

3. Obtenção do vetor

O vetor pLenti-eGFP foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Thiago Aparecido da Silva da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP. A fim de manter uma cópia, o mesmo foi primeiramente transformado por choque térmico em células de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) quimiocompetente e o clone foi selecionado em meio de cultura Luria Bertani (LB) contendo 100 μ g/mL de ampicilina.

Colônias transformadas foram inoculadas em 50 mL de LB com ampicilina. As células foram coletadas por centrifugação e o vetor pLenti-eGFP foi recuperado por meio de uma purificação plasmidial. Neste procedimento, as células foram ressuspensas em 20 mL de tampão salina-fosfato (PBS) e precipitadas por centrifugação. As células foram ressuspensas em 4 mL do tampão 1 (TE, 100 mM Tris pH 8,0 e 50 μ M de EDTA pH 8,0) contendo RNase A. Em seguida, foram lisadas em 4 mL do tampão 2 (2% dodecilsulfato de sódio e 200 mM de NaOH), em temperatura ambiente por 5 min. A alcalinidade foi neutralizada pela adição de 4 mL do tampão 3 (acetato de potássio 3 M, pH 5,5), proporcionando a precipitação do lisado celular contendo o DNA genômico, o qual foi separado do DNA plasmidial, em solução, por centrifugação a 17.000xg por 30 min. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e o DNA plasmidial foi precipitado pela adição de isopropanol, incubando a -20°C por 30 min, seguido de centrifugação a 6.000xg por 30 min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi lavado com 1 mL de etanol 75% e ressuspendido em 0,4 mL do tampão TE e essa solução foi transferida para um microtubo.

O DNA plasmidial foi então tratado com RNase A por 1 h a 30°C. Após esse tempo, o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (PCI, 24:1:1) foi adicionado e homogeneizado, sendo centrifugado a 12.000xg por 5 min. A fase superior polar foi coletada e PCI foi novamente adicionado, a solução foi centrifugada e a fase superior coletada. A fase foi transferida para uma coluna de purificação do kit de Purificação de PCR (GeneJet, Thermo Scientific), adicionando o tampão de ligação. Após centrifugação, a membrana foi lavada com tampão contendo etanol e o DNA plasmidial foi ao final eluído em 50 μ L de TE. Sua concentração foi quantificada por espectrofotometria em Nanodrop 2000 e sua qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio.

O mesmo procedimento de recuperação de DNA plasmidial foi realizado para a recuperação do vetor contendo a sequência de codificação das proteínas essenciais para o Lentivírus (psPAX2, Addgene #12260) e para o vetor codificando a glicoproteína do envoltório viral (pMD2.G/VSVG, Addgene #12259).

4. Clonagem

Para realização de um processo de clonagem clássica, os produtos de PCR (as sequências codificadoras de OVA e tOVA) e o vetor pLenti-eGFP foram digeridos com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Bam*HI (Thermo Scientific). Para tanto, foram utilizados cerca de 800 ng dos produtos de PCR e do vetor, em reações separadas, às quais foram adicionados o tampão da digestão e 1 U de cada enzima, completando o volume reacional com água ultrapurificada para 20 µL. As reações foram mantidas a 37°C por 50 min. O vetor foi desfosforilado pela adição de 1 U de fosfatase alcalina FastAp (Thermo Scientific), a 37°C por 10 min. Os produtos de digestão foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Em seguida, a ligação foi realizada pela adição de 15 ng de cada produto de PCR digerido, separadamente, com 40 ng do vetor digerido e desfosforilado e 1 U da T4 DNA ligase (Thermo Scientific) em tampão. As reações foram mantidas overnight a 4°C e depois, cada uma, foi transformada em *E. coli* DH5α quimiocompetente por choque térmico. Os clones positivos foram recuperados em LB com ampicilina.

5. Confirmação da clonagem

A partir das colônias transformantes foram realizados inóculos em 5 mL de LB-ampicilina para obtenção do DNA plasmidial e checagem da clonagem. O DNA plasmidial de cada colônia foi recuperado utilizando o kit de Miniprep (GeneJet, Thermo Scientific), de acordo com o protocolo, basicamente seguindo as mesmas etapas descritas no item 3, mas em menor escala. A clonagem foi então confirmada por diagnóstico de restrição, submetendo cada DNA recombinante obtido (~500 ng) a uma digestão com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI (1 U de cada, Fast Digest, Thermo Scientific) usando as mesmas condições descritas no item 4. Os fragmentos de DNA gerados pela digestão foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose.

6. Transfecção de células HEK-293

As células de rim de embrião humano (HEK-293 ATCC CRL-1573™) foram mantidas aderidas em garrafa a 37°C, em 5% de CO₂, na presença de meio de cultura DMEM com 10% de soro bovino fetal e 10 µg/mL de gentamicina até uma confluência de 80-90%. Ao atingirem confluência, foram submetidas a tripsinização, como descrito no item 1 e cerca de 1.10⁶ células foram incubadas em garrafas T25.

Para a transfecção, os plasmídeos codificadores da partícula viral psPAX2 e pMD2.G/VSVG foram homogeneizados, separadamente, com o plasmídeo de transferência pLenti-eGFP, pLenti-OVA-eGFP e pLenti-tOVA-eGFP. A homogeneização foi realizada com o polímero catiônico polietilenonimina (PEI, Sigma Aldrich), que facilita a aproximação do

material genético à célula [22]. Foram misturados cerca de 3,3 µg de cada plasmídeo, numa proporção 1:2,5 (m/m) com o PEI [17]. As partículas poliméricas de plasmídeos foram adicionadas às células, juntamente com o meio de cultura sem soro e mantidas por 1 h a 37°C, quando então foram adicionados 10% de FBS e a incubação foi feita por 72 h para produção das partículas virais e acúmulo no sobrenadante.

RESULTADOS

Uma vez que não foi possível encontrar o vetor de transferência contendo a sequência de OVA, o presente trabalho focou em construir esse reagente e estes resultados estão descritos neste relatório.

Assim, após realizar a extração do DNA genômico das células cedidas de melanoma contendo a sequência codificadora de OVA, este material foi utilizado como molde para a amplificação da sequência completa e truncada (tOVA), sem o sinal de membrana. Confirmou-se a obtenção das sequências por PCR por meio de eletroforese, observando uma banda de tamanho próximo a 1100 pares de bases (pb) para OVA e de cerca de 1000 pb para tOVA.

Realizadas a digestão do vetor e dos insertos, as moléculas de DNA foram recombinadas e as construções foram confirmadas por diagnóstico de restrição usando as mesmas endonucleases da clonagem. Com a eletroforese dessas reações, observou-se uma banda com tamanho próximo a 1000 pb e outra de 10 kb para os clones positivos, referentes, respectivamente, ao tamanho do inserto (OVA e tOVA) e do vetor (pLenti-eGFP).

Todos os vetores foram posteriormente obtidos em média escala (midiprep) a fim de obter material suficiente para a transfecção das células de HEK293. Com a transfecção, as partículas virais são formadas mas a forma de se conhecer a razão de número de partículas por células infectadas (“Multiplicity of infection”, MOI) é por meio da transdução de novo inóculo de células HEK293, em uma diluição conhecida do meio com as partículas [24]. A obtenção da linhagem modificada de neuroblastoma também deve ser realizada por transdução.

DISCUSSÃO

Com a realização deste trabalho, procurou-se principalmente gerar um reagente que proporcione a obtenção de uma linhagem de células com expressão permanente de OVA e não com expressão transiente. Ou seja, a fim de que a linhagem de neuroblastoma fosse geneticamente modificada permanentemente, passando a sequência codificadora de OVA para suas células filhas, procurou-se trabalhar com um sistema de transferência gênica que proporcionasse a alteração genômica da célula de neuroblastoma [24]. Para tanto, foi escolhido o sistema lentiviral de segunda geração, que emprega dois vetores codificando a partícula viral e um vetor de transferência, o qual, após transfectado em HEK293 vai levar à formação do RNA genômico

contendo a sequência de OVA. Esta, então, será integrada ao genoma da linhagem escolhida (neuroblastoma) para expressão estável após transfecção dessa partícula viral montada [17].

O vetor de transferência foi obtido com sucesso e purificado em quantidade suficiente para a transdução das células de HEK293 para avaliação do MOI e das células de neuroblastoma. Infelizmente, devido a problemas técnicos ocorridos durante a execução deste trabalho e sua finalização adiantada devido à contratação da bolsista como Professora Assistente, não foi possível obter esses resultados a tempo para o relatório. Contudo, os experimentos continuam sendo executados por demais membros do grupo e logo estarão disponíveis para consulta e publicação e os reagentes gerados serão empregados em futuros estudos de avaliação da ativação de células T por células dendríticas que eferocitaram células apoptóticas que contenham esses vetores virais e que estejam infectadas por ZIKV.

É importante ressaltar que durante a execução deste Pós-doutorado, a bolsista participou ativamente em atividades de outras pesquisas, incluindo orientação de estudantes de graduação, ensino para Graduação e Pós-graduação e também em extensão.

Nas atividades de Pesquisa, a bolsista contribuiu com um trabalho de expressão de genes relacionados à resposta imunológica em camundongos, do projeto sob coordenação da Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, em Jaboticabal. Também orientou duas estudantes de graduação em projetos de treinamento técnico, sem bolsa.

Na área de Ensino, a bolsista ministrou aulas de Biologia Molecular para o curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, tendo 8 h/aula semanais por 4 semanas (32 horas totais). Na Pós-graduação, a bolsista participou da disciplina de Fundamentos em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, no tópico de Biologia Molecular e com carga horária total de 12 horas.

Em relação à Extensão, a bolsista participou do Curso de Inverno do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, pelo período de 4 h, abordando o tema de modificação genética de células de mamífero a estudantes de graduação, profissionais e estudantes de pós-graduação inscritos para o evento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, 2016.
2. TANG, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, 2016.
3. FIGUEIREDO, C. P. et al. Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

4. QIU, H. et al. Efferocytosis: An accomplice of cancer immune escape. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2023.
5. TZELEPIS, F. et al. Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 2, 2015.
6. DORAN, A. C.; YURDAGUL, A.; TABAS, I. Efferocytosis in health and disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 20, n. 4, p. 254–267, 2020.
7. ACKERMAN, A. L. et al. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 22, p. 12889–12894, 2003.
8. TIAN, L. et al. Enhanced efferocytosis by dendritic cells underlies memory T-cell expansion and susceptibility to autoimmune disease in CD300f-deficient mice. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 6, p. 1086–1096, 2016.
9. LUGOVAYA A.V. et al. Spontaneous and activation-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. **Medical Immunology (Russia)**, 2020.
10. CHANG, K. et al. Ferulic acid-ovalbumin protein nanoparticles: Structure and foaming behavior. **Food Research International**, v. 136, p. 109311, 2020.
11. HUNTINGTON, J. A.; STEIN, P. E. Structure and Properties of Ovalbumin. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 756, n. 1, p. 189–198, 2001.
12. OH, Y.-J. et al. Ovalbumin and cholera toxin delivery to buccal mucus for immunization using microneedles and comparison of immunological response to transmucosal delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 4, p. 1390–1400, 2021.
13. ROWE, H. M. et al. Immunization with a lentiviral vector stimulates both CD4 and CD8 T cell responses to an ovalbumin transgene. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 13, n. 2, p. 310–319, 2006.
14. YANG, L. et al. Engineered lentivector targeting of dendritic cells for in vivo immunization. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 326–334, 2008.
15. LUO, X. et al. Platelet-Targeted Gene Transfer Induces Immune Tolerance through Two Distinct Pathways. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 4423–4423, 2015.
16. GILL, K. P.; DENHAM, M. Optimized Transgene Delivery Using Third-Generation Lentiviruses. **Current protocols in Molecular Biology**, v. 133, n. 1, 2020.
17. ELEGHEERT, J. et al. Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins. **Nature Protocols**, v. 13, n. 12, p. 2991–3017, 2018.
18. GOMEZ-LUCIA, E. Animal Lentiviruses (Retroviridae). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128145159000059?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jun. 2024.

19. ZHENG, J.; WEI, Y.; HAN, G.-Z. The diversity and evolution of retroviruses: Perspectives from viral “fossils”. **Virologica Sinica**, v. 37, n. 1, p. 11–18, 2022.
20. COCKRELL, A. S.; KAFRI, T. Gene delivery by lentivirus vectors. **Molecular Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 184–204, 2007.
21. DULL, T. et al. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 8463–8471, 1998.
22. PEZZOLI, D. et al. Size matters for in vitro gene delivery: investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. **Scientific Reports**, 7, 2017.
23. FUS-KUJAWA, A. et al. An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells “in vitro”. **Frontiers Bioengineering Biotechnology**, v. 9, 2021.