



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MICAELA EVELLIN DOS SANTOS SILVA

**PERSPECTIVAS DO USO DA *Leishmania tarentolae* COMO
PLATAFORMA PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS**

Recife
2023

MICAELA EVELLIN DOS SANTOS SILVA

**PERSPECTIVAS DO USO DA *Leishmania tarentolae* COMO
PLATAFORMA PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Co-orientadora: Larissa Silva de Macêdo

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Micaela Evellin dos Santos.

Perspectivas do uso da *Leishmania tarentolae* como plataforma para o desenvolvimento de vacinas / Micaela Evellin dos Santos Silva. - Recife, 2023.
57 p. : il., tab.

Orientador(a): Antonio Carlos de Freitas

Coorientador(a): Larissa Silva de Macêdo

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. *Leishmania* spp.. 2. Imunoterapia. 3. Vacinação. 4. Sistema heterólogo de expressão. 5. Imunização. I. Freitas, Antonio Carlos de. (Orientação). II. Macêdo, Larissa Silva de. (Coorientação). IV. Título.

500 CDD (22.ed.)

MICAELA EVELLIN DOS SANTOS SILVA

**PERSPECTIVAS DO USO DA *Leishmania tarentolae* COMO
PLATAFORMA PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr Antonio Carlos de Freitas
Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) - UFPE

Dra. Anna Jéssica Duarte Silva
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Genética

Prof. Dr. Christian Robson de Souza Reis
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ Pernambuco/ Departamento de Microbiologia

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Antonio Carlos de Freitas, por ter aceitado me acompanhar nesse projeto e por ser uma grande fonte de inspiração e admiração.

A minha co-orientadora Msc. Larissa Silva de Macêdo por ter me guiado de perto em todo esse processo, por sua paciência e grande orientação em todos os passos do trabalho. Obrigada por ter me passado calma e segurança durante toda a escrita e desenvolvimento do trabalho e pelos ensinamentos que me ajudaram a melhorar e evoluir.

Agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho.

Agradeço aos meus pais e familiares pelo apoio, incentivo e por terem investido em mim. A realização desse trabalho só foi possível por terem acreditado na minha capacidade.

Aos meus amigos que me deram todo o suporte necessário durante toda a minha jornada de graduação até esse momento de conclusão do curso. Em especial, agradeço ao meu amigo Gustavo por me escutar, pelas risadas e pela companhia em chamadas durante o processo de escrita. A Marília pela sua amizade e pelos momentos compartilhados e a Vivian por sempre me dar força e nunca duvidar de mim.

Por fim, gostaria de agradecer também as pessoas que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho. Às pessoas com quem convivi ao longo desses anos de curso, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica.

“A vida é uma escultura que você esculpe ao cometer erros e aprender com eles.” (Kim Namjoon)

SILVA, Micaela Evellin dos Santos. **Perspectivas do uso da *Leishmania tarentolae* como plataforma para o desenvolvimento de vacinas**. 2023. 57. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

O protozoário *Leishmania tarentolae* pertencente ao gênero *Leishmania*, subgênero *Sauroleishmania*, é considerado não patogênico para humanos. Além disso, tem sido explorado em diversas aplicações biotecnológicas para o desenvolvimento de vacinas como uma potencial plataforma de produção de proteínas recombinantes. Na aplicação biotecnológica, cada sistema de expressão heterólogo possui vantagens e desvantagens na produção de proteínas recombinantes, sendo assim é vantajoso a procura por microrganismos que sejam eficientes, seguros e que possuam um bom custo-benefício. Esse protozoário tem como característica semelhanças genéticas com espécies patogênicas do gênero *Leishmania* podendo ser usada no controle terapêutico de leishmanioses e como modelo de estudo. Em razão do seu potencial para a produção vacinal, são necessários mais estudos sobre a biologia da *L. tarentolae* para maiores esclarecimentos sobre seus mecanismos e possíveis usos. Nesse âmbito, esse trabalho tem como objetivo discutir o uso da *L. tarentolae* em diferentes estratégias vacinais, pontuando seu uso para produção de proteínas recombinantes, como vacina viva e em abordagens terapêuticas, assim como verificar em qual patamar se encontram os atuais estudos que utilizam a *L. tarentolae*. Espera-se que essa revisão de literatura sirva para promover um maior nível de entendimento sobre a aplicabilidade do protozoário e como base para futuros estudos sobre seu uso no desenvolvimento de estratégias vacinais assim como as vantagens que o sistema utilizando *L. tarentolae* apresenta em relação aos outros sistemas de expressão atualmente utilizados. Para atingir esse fim, foi realizada uma revisão sistemática e transversal, através da análise de artigos científicos obtidos por meios eletrônicos nas bases de dados *Scielo*, *PubMed*, *Science Direct* e *Google Scholar* sendo incluídos artigos tendo como idioma o inglês, entre os anos de 2019 e 2023, sendo excluídos teses, artigos duplicados, dissertações, resumos publicados em eventos científicos e artigos que não apresentem relevância ao tema de estudo do trabalho. Após a leitura e aplicação dos critérios adotados foram obtidos 51 artigos. Desse modo, este trabalho evidencia que *L. tarentolae* é aplicável para diferentes fins, incluindo a produção de produtos terapêuticos, como glicoproteínas de interesse médico; expressando sequências multiepítopos, como plataforma para o desenvolvimento de vacinas profiláticas, como ferramenta para produção de insumos para testes diagnósticos e também como modelo experimental contra Leishmanioses. Assim, conclui-se que os diversos campos de aplicação do protozoário tornam-no microrganismo modelo para diferentes estratégias vacinais contra doenças que necessitem de melhores abordagens ou que atualmente não possuem tratamento adequado.

Palavras-chave: *Leishmania spp.* Imunoterapia. Vacinação. Sistema heterólogo de expressão. Imunização.

SILVA, Micaela Evellin dos Santos. **Perspectives on the use of *Leishmania tarentolae* as a platform for vaccine development.** 2023. 57. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

The protozoan *Leishmania tarentolae*, belonging to the genus *Leishmania*, subgenus *Sauroleishmania*, is considered non-pathogenic for humans. Furthermore, it has been explored in several biotechnological applications for the development of vaccines as a potential platform for the production of recombinant proteins. In biotechnological applications, each heterologous expression system has advantages and disadvantages in the production of recombinant proteins; therefore, it is advantageous to search for microorganisms that are efficient, safe, and have a good cost-benefit ratio. The protozoan has genetic similarities with pathogenic species of the genus *Leishmania*, which can be used in the therapeutic control of leishmaniasis and as a study model. Due to its importance for vaccine production, more studies on the biology of *L. tarentolae* are needed to further clarify its mechanisms and possible uses. In this context, this literature review aims to discuss the use of *L. tarentolae* in different vaccine strategies, highlighting its use for the production of recombinant proteins, as a live vaccine, and in therapeutic approaches, as well as verifying the level at which current studies are located that use *L. tarentolae*. To achieve this end, a systematic and cross-sectional review was carried out through the analysis of scientific articles obtained by electronic means in the Scielo, PubMed, Science Direct, and Google Scholar databases, including articles using English as the language, between the years 2019 and 2023, excluding theses, duplicate articles, dissertations, abstracts published in scientific events, and articles that are not relevant to the study topic of the work. After reading and applying the adopted criteria, 51 articles were obtained. Therefore, it is expected that this literature review will serve to promote a greater level of understanding about the applicability of the protozoan and as a basis for future studies on its use in the development of vaccine strategies, as well as the advantages that the system using *L. tarentolae* presents in relation to other expression systems currently applied. This work shows that *L. tarentolae* is applicable for different purposes, including the production of therapeutic products, such as glycoproteins of medical interest; expressing multiepitope sequences; as a platform for the development of prophylactic vaccines; as a tool for producing inputs for diagnostic tests; and also, as an experimental model against Leishmaniasis. Thus, it is concluded that the diverse fields of application of the protozoan make it a model microorganism for different vaccine strategies against diseases that require better approaches or that currently do not have adequate treatment.

Key words: *Leishmania spp.* Immunotherapy. Vaccine. Heterologous System. Immunization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação filogenética do gênero <i>Leishmania</i>	14
Figura 2 – Formas morfológicas de <i>Leishmania (S.) tarentolae</i> em flebotomíneos <i>Phlebotomus</i>	15
Figura 3 – Ciclo biológico <i>L. tarentolae</i>	17
Figura 4 – Fluxograma de triagem e seleção dos estudos.....	32
Figura 5 – Representação esquemática do vetor para <i>Leishmania tarentolae</i>	34
Figura 6 – Representação dos padrões de glicosilação em diferentes sistemas de expressão.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as vantagens e desvantagens dos sistemas de expressão.....	24
Tabela 2 — Exemplos de proteínas recombinantes expressas em <i>L. tarentolae</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
BEVS	<i>Baculovirus expression vector system</i>
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro-Coração)
ble	Bleomicina
bsd	Blasticidina
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> (Vírus da Hepatite B)
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> (Vírus da Hepatite C)
HEV	<i>Hepatitis E virus</i> (Vírus da Hepatite E)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)
hyg	Higromicina fosfotransferase
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i> (DNA do cinetoplasto)
KMP11	<i>Kinetoplastid membrane protein-11</i>
LACK	<i>Leishmania-activated C-kinase</i>
Lbk39	<i>Kinesin-related gene of Leishmania braziliensis</i> (Proteína relacionada com o gene da cinesina de <i>Leishmania braziliensis</i>)
LeIF	<i>Leishmania eukaryotic initiation factor</i>
LCM	Leishmaniose mucocutânea
MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex class 1</i> (Complexo de histocompatibilidade principal classe I)

MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex class 2</i> (Complexo de histocompatibilidade principal classe II)
MSC	Múltiplo sítio de clonagem
mRNA	RNA mensageiro
MUC1	Mucina 1
neo	Aminoglicosídeo fosfotransferase
NoV	<i>Norovirus</i>
NP	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial da Saúde
Ori	Origem de replicação
pac	Puromicina acetiltransferase
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
pol	Polimerase
poly-A	<i>Polyadenylation</i> (Poliadenilação)
RBD	<i>Receptor binding domain</i>
rFc	Receptores Fc
RNA	Ácido ribonucleico
SAP	Fosfatase ácida secretada
SAP1	Fosfatase ácida secretada 1
sat	Estreptotricina acetiltransferase
scFv	Fragmento de anticorpo de cadeia única
SMT	<i>Sterol methyltransferase</i>
SP	Peptídeo sinal
Sp2/0	<i>Mouse-derived myeloma</i>
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i> (Vírus da encefalite transmitida por carrapatos)
TET	Tetraciclina
TLR	Receptores <i>toll-like</i>
TR	Proteína repressora TET
VL	Leishmaniose visceral
VLPs	<i>Virus-like particles</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	<i>LEISHMANIA TARENTOLAE</i>	13
2.1.1	Aplicações biotecnológicas da <i>Leishmania tarentolae</i>	17
2.2	SISTEMAS DE EXPRESSÃO.....	18
2.3	VACINAS.....	26
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	TIPO DE PESQUISA.....	31
4.2	PLATAFORMAS DE PESQUISA.....	31
4.3	ESTRATÉGIAS DE BUSCA.....	31
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	31
4.5	ORGANIZAÇÃO DOS ARTIGOS SELECIONADOS.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	PARÂMETROS, VETORES E CONDIÇÕES DE USO E CULTIVO DE <i>L. TARENTOLAE</i>	33
5.2	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>L. TARENTOLAE</i>	38
5.3	PROFILAXIA E TRATAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS UTILIZANDO <i>L. TARENTOLAE</i>	40
5.3.1	Uso Como Vacina Viva.....	40
5.3.2	Imunoterapia.....	44
5.3.3	Modelo Anti- <i>Leishmania</i>	47
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A *Leishmania tarentolae* é uma espécie não patogênica em humanos e outros mamíferos, pertencente ao gênero *Leishmania* e ao subgênero *Sauroleishmania* que possui um grande potencial de uso biotecnológico em razão de seus aspectos biológicos. Apesar de ser não patogênica para mamíferos, as duas principais cepas de *L. tarentolae*, TAR e LEM, podem ser infecciosas de maneira transitória. Isso ocorre devido ao fato de que promastigotas de *L. tarentolae* são capazes de infectar células fagocíticas humanas e se diferenciar em formas semelhantes a amastigotas, mas não há evidência clara de sua replicação dentro dos macrófagos (Klatt et al., 2019).

Devido a este fato e por causa da sua semelhança genética com outras espécies de *Leishmania*, *L. tarentolae* é considerado um modelo promissor para estudos relacionados ao tratamento de espécies patogênicas do gênero *Leishmania* (Klatt et al., 2019; Mendoza-Roldan et al., 2021). Ou seja, suas semelhanças genéticas permitem o estudo de espécies patogênicas, mas as diferenças genéticas podem explicar porque ocorre a infecção de maneira transitória (Klatt et al., 2019).

Outro ponto chave, é que os sistemas de expressão utilizando a *L. tarentolae* podem ser expandidos com facilidade para produção em escala industrial de proteínas, além de apresentar uma boa relação de custo-benefício para o seu cultivo (Klatt et al., 2019). Além disso, por se tratar de um microrganismo eucarioto, tem como vantagem a capacidade de produzir proteínas, como por exemplo fragmentos funcionais de anticorpos semelhantes àquelas produzidas por mamíferos e glicoproteínas humanas. Sendo assim, é possível que a *L. tarentolae* seja aplicada para o desenvolvimento de estratégias vacinais profiláticas, como também terapêuticas (Klatt et al., 2019; Mendoza-Roldan et al., 2022).

As vacinas são uma das ferramentas de controle e combate de doenças mais eficazes em saúde pública e nas últimas décadas a utilização de microrganismos não patogênicos em seu desenvolvimento representa um grande

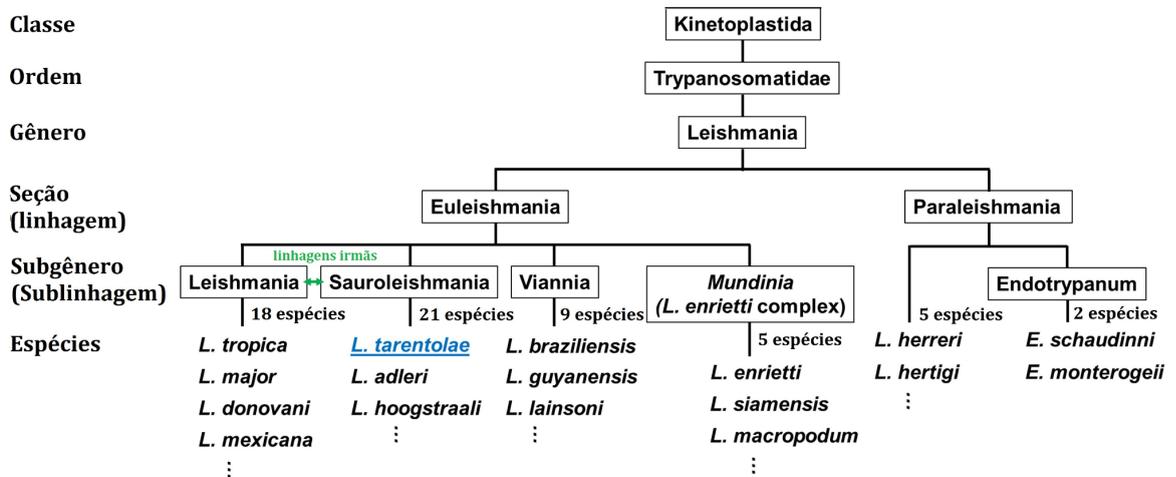
avanço na área de biotecnologia e imunoterapia, contribuindo para que novas técnicas e fórmulas possam ser pesquisadas e aprimoradas. (Brisse et al., 2020; Kayser e Ramzan, 2021).

Desta forma, essa revisão de literatura tem como objetivo principal reunir dados que indiquem a relevância das aplicações biotecnológicas da *L. tarentolae* na terapêutica e na profilaxia, identificar em qual patamar se encontram os principais estudos que utilizam o protozoário para o desenvolvimento vacinal assim como seu uso como biofábrica na produção de proteínas recombinantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *LEISHMANIA TARENTOLAE*

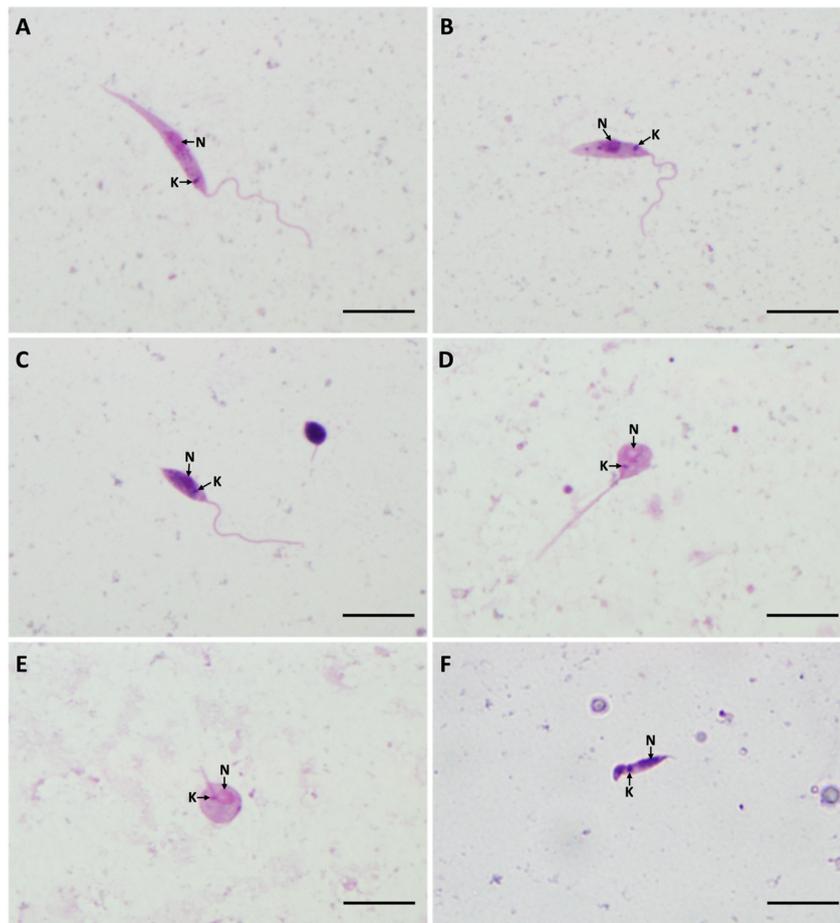
O gênero *Leishmania* faz parte da família Trypanosomatidae, da classe Kinetoplastea e possui 4 subgêneros: *Leishmania*, *Sauroleishmania*, *Viannia* e *Mundinia*. O grupo possui espécies patogênicas e não patogênicas. O subgênero *Sauroleishmania* ao qual a *L. tarentolae* e outras 21 espécies pertencem não se trata de um grupo homogêneo devido às peculiaridades apresentadas por algumas das espécies (Figura 1) (Klatt et al., 2019, Ticha et al., 2021). Esse subgênero é restrito ao Norte da África, Europa e Oriente Médio, infectando répteis e sendo transmitido pelo flebotomíneo pertencente ao gênero *Sergentomyia* (Klatt et al., 2019; Bandi et al., 2023). Porém, mesmo que *Leishmania* e *Sauroleishmania* sejam grupos irmãos pouco se foi estudado sobre *Sauroleishmania* por se tratar de um subgênero que é não patogênico para mamíferos, assim informações sobre sua biologia e das espécies pertencentes ao grupo são limitadas (Ticha et al., 2021). Contudo, há relatos na literatura de que algumas espécies de *Sauroleishmania* podem ser patogênicas de forma transitória em mamíferos ou em células de mamíferos (Ticha et al., 2021).

Figura 1 - Classificação filogenética do gênero *Leishmania*.

Fonte: Adaptado de Klatt et al. (2019)

A *L. tarentolae* é a espécie mais bem estudada de *Sauroleishmania* (Ticha et al., 2021). Por se tratar de um protozoário da classe Kinetoplastea, a *L. tarentolae* é um organismo unicelular, com flagelo único e cinetoplasto, uma organela rica em DNA (Figura 2) (Klatt et al., 2019, Shokouhy et al., 2022). Já foi demonstrado anteriormente que a *L. tarentolae* pode ser promissora como vacina viva no combate às leishmanioses, em especial a Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose visceral (LV) (Shokouhy et al., 2022), assim como pode ter usos no desenvolvimento de vacinas contra uma ampla variedade de vírus e contra diversos outros agentes infecciosos (Varotto-Boccazzi et al., 2021, Bandi et al., 2023).

Figura 2 - Formas morfológicas de *Leishmania (S.) tarentolae* em flebotomíneos *Phlebotomus*. (A) nectomonada alongada; (B) nectomonada curta; (C) promastigota metacíclica; (D) promastigota metacíclica arredondada; (E) paramastigota arredondada; (F) haptomonada. N - Núcleo; K, Cinetoplasto (corado por Giemsa, ampliação de 1000×, barra de escala = 10 µm).

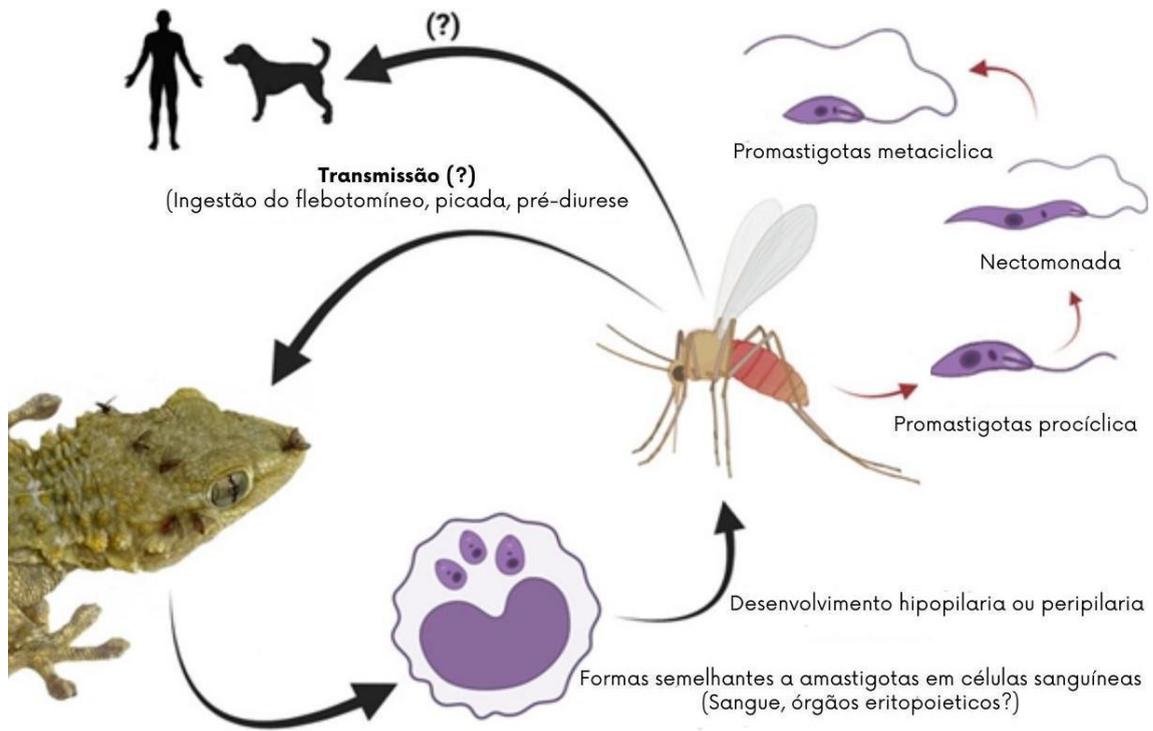


Fonte: Ticha et al. (2021)

O ciclo biológico de espécies de *Sauroleishmania* ainda não foi completamente esclarecido. Os parasitas desse subgênero se desenvolvem no flebotomíneo *Sergentomyia* na forma promastigota, já a forma amastigota, livre ou dentro de monócitos e eritrócitos, é raramente observada. Apesar da transmissão para o vetor nunca ter sido demonstrada, acredita-se que ocorra de forma similar a aquela descrita para o vetor de mamíferos. Além disso, não é esclarecido se formas promastigostas metacíclicas ou outras formas se desenvolvem no flebotomíneo *Sergentomyia* (Figura 3). Quanto à distribuição geográfica, o flebotomíneo e os répteis (*Tarentola annularis* e *Tarentola mauritanica*) são encontrados no Sul da Europa, no Norte da África e no Oriente Médio, assim a prevalência de *L. tarentolae* está relacionada aos locais onde os flebotomíneos e os répteis que fazem parte do seu ciclo biológico são encontrados (Klatt et al., 2019, Ticha et al., 2021, Bandi et al., 2023, Ennes-Vidal et al., 2022).

Entretanto, foi encontrado DNA de *L. tarentolae* em diferentes espécies de *Phlebotomus*, sendo assim é possível concluir que *Sergentomyia* não é o único vetor possível para o desenvolvimento de *Sauroleishmania* e há possibilidade de que o protozoário possa circular em mamíferos (Bandi et al., 2023). Ademais, experimentos indicam que cepas de *L. tarentolae* podem se desenvolver no gênero *Phlebotomus*, tendo uma boa taxa de sucesso nas espécies *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus perniciosus* em comparação com *Phlebotomus sergenti*, assim é confirmado que esses flebotomíneos podem ter um papel na transmissão de *Sauroleishmania* devido ao seu comportamento oportunista, pois se trata de um gênero que tem preferência alimentar por mamíferos (Ticha et al., 2021). O desenvolvimento em *Ph. papatasi* e em *Ph. perniciosus*, mas não em *Ph. sergenti* também indica que o desenvolvimento de *Sauroleishmania* é influenciado pela espécie de inseto. Todos esses indícios apontam para potencial infecção em mamíferos (Bandi et al., 2023).

Figura 3 - Ciclo biológico *L. tarentolae* em vetores e hospedeiros. Em reptéis, a forma semelhante a amastigota se desenvolve em células sanguíneas, o DNA do parasita já foi detectado no sangue e em órgãos eritropoéticos. O flebotomíneo ingere as células sanguíneas infectadas durante a alimentação e o parasita se diferencia na forma promastigota e assim se desenvolve de forma hipopilaria ou perifilaria. As possíveis rotas de transmissão para hospedeiros vertebrados são através da picada do flebotomíneo, ingestão oral do mosquito ou de maneira contaminante por pré-diurese. Transmissão e desenvolvimento em mamíferos não é conhecido.



Fonte: Adaptado de Mendoza-Roldan et al. (2022)

2.1.1 Aplicações biotecnológicas da *Leishmania tarentolae*

Em razão de suas semelhanças genéticas com espécies patogênicas de *Leishmania*, o protozoário é utilizado como modelo de estudo para o tratamento de leishmanioses por meio de uma abordagem terapêutica, assim como pode ser usada em vacinas profiláticas. *L. tarentolae* também é utilizada como modelo de estudo da organização do DNA do cinetoplasto (kDNA). Por se tratar de um organismo eucarioto, pode ser aplicado como sistema de expressão de proteínas recombinantes mais complexas. O sistema de expressão utilizando *L. tarentolae* é capaz de expressar fragmentos funcionais de anticorpos de mamíferos e glicoproteínas humanas (Klatt et al., 2019, Shokouhy et al., 2022).

O sistema de expressão utilizando *L. tarentolae* não apresenta as limitações que são observadas em outros sistemas de expressão tradicionais como bactérias, leveduras, células de mamíferos, entre outros. Além disso tem baixo custo, é fácil de cultivar sendo possível produzir em escala industrial utilizando biofábricas e também proporciona uma quantidade satisfatória de

proteínas recombinantes a depender do propósito de aplicação (0.1-30 mg/L) (Klatt et al., 2019, Lai et al., 2019, Bandi et al., 2023, Shokouhy et al., 2022).

O protozoário é rico em glicoproteínas e devido aos seus mecanismos de modificações pós-traducionais é capaz de promover N-glicosilação e O-glicosilação homogêneas e semelhantes às de células de mamíferos (Lai et al., 2019, Klatt et al., 2019, Majidiani et al., 2021, Bandi et al., 2023, Shokouhy et al., 2022). No caso de N-glicanos apenas os ácidos siálicos terminais (Ácido N-acetilneuramínico) estavam faltando na proteína recombinante após o processo de glicosilação, isso ocorre pois *Leishmania* não tem as enzimas necessárias para a via de biossíntese de ácidos siálicos. Proteínas de multi-subunidade também são completamente expressas em *L. tarentolae*, portanto como os anticorpos são proteínas com multi-subunidades e glicosiladas é possível que possam ser expressas em *L. tarentolae* (Klatt et. al., 2019).

A glicosilação é de suma importância pois mais de 50% das proteínas humanas são glicosiladas sendo um processo essencial para a atividade dessas proteínas, sendo também um mecanismo de controle de qualidade em relação ao dobramento de proteínas (Lai et al., 2019).

L. tarentolae tem sido um vetor bastante utilizado para clonar e expressar genes devido aos seus diversos benefícios como sistema de expressão. Além disso, foi utilizado para a expressão de várias proteínas de parasitas, como o gene A2 e cisteína-proteinases, com sucesso tendo um grande potencial para a expressão heteróloga (Bavarsad Ahmadpour; Dalimi; Pirestani, 2022).

2.2 SISTEMAS DE EXPRESSÃO

Ao longo dos anos a demanda por biofármacos vem crescendo de forma considerável. Sendo assim, se faz necessário que ocorra desenvolvimento dos sistemas para expressão de proteínas recombinantes, seja melhorando os sistemas de expressão já existentes ou elaborando novos sistemas de expressão que utilize diferentes microrganismos e sejam mais eficientes. Desse modo, procura-se por rendimentos melhores e pela redução dos custos de produção,

permitindo a viabilidade de uma produção em escala industrial. Assim, torna-se possível que novos tratamentos e drogas sejam criados para aplicação terapêutica para uso em diversas doenças e distúrbios patológicos (Tripathi e Shrivastava, 2019).

Independente do propósito da aplicação, a produção de proteínas recombinantes segue um mesmo processo básico. De forma simplificada, é necessário isolar a sequência de ácido nucléico de interesse, em seguida ocorre a junção dessa sequência em plasmídeos que são inseridos em um sistema de expressão que irá produzir a proteína recombinante, dessa maneira estabelecendo uma cultura celular. Quando a cultura celular alcança um bom crescimento com alta densidade celular, as proteínas são purificadas e aplicadas para o propósito de interesse (Tripathi e Shrivastava, 2019). Após os passos de desenvolvimento da linhagem celular e da seleção clonal, é realizada uma triagem da expressão das proteínas recombinantes através da cultivo em menor escala onde várias condições podem afetar o desenvolvimento como por exemplo, a composição do meio, pH, agitação, aeração, temperatura, densidade celular, concentração de indutores e tempo de indução (Tripathi e Shrivastava, 2019).

Para aumentar a eficiência da produção, algumas estratégias podem ser adotadas, tais como o acréscimo de elementos de DNA para aumentar a estabilidade gênica e secreção de proteínas, como promotores eficientes, enhancers, sequências para otimizar o número de cópias e otimização do códon (Puetz e Wurm, 2019).

Os sistemas de expressão podem ser procariotas ou eucariotas e utilizar bactérias, leveduras, células de insetos, fungos, células de mamíferos, plantas e animais transgênicos. Atualmente, existem diversos sistemas de expressão disponíveis comercialmente para a produção de proteínas recombinantes e cada sistema possui suas vantagens e desvantagens. Portanto, a escolha do sistema de expressão depende da proteína de interesse a ser produzida e suas características biológicas. As diferenças entre os sistemas de expressão estão relacionadas com as diferenças entre as células do microrganismo de escolha. Por exemplo, é preferível produzir proteínas pequenas e peptídeos que não

necessitam de dobramento complexo e modificações pós-traducionais em bactérias, já leveduras podem produzir proteínas mais complexas enquanto células de mamíferos são ideais para produção de proteínas grandes com dobramento complexo e que necessitam de modificações pós-traducionais (Karbalei et al., 2020, Owczarek et al., 2019, Puetz e Wurm, 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019).

Os sistemas de expressão que utilizam bactérias tem como vantagens baixo custo, rápido crescimento, médio rendimento e facilidade de manuseio. O sistema de expressão utilizando *Escherichia coli* é a escolha mais usual para a expressão heteróloga além das vantagens citadas acima, os protocolos para expressão de proteínas nesse microrganismo são bem estabelecidos. Além disso, a bioquímica e genética da *E. coli* são conhecidas em detalhes (Karbalei et al., 2020, Morão et al., 2022; Owczarek et al., 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019). O sistema apresentam desvantagens, como por exemplo falta de modificações proteicas pós-traducionais corretas (PTMs), dificuldades no dobramento de proteínas e a presença de inclusões (Klatt et al., 2019, Shokouhy et al., 2022).

O sistema de *E. coli* e o bacteriófago T7 RNA polimerase é o mais comum e é recomendado para a expressão de proteínas globulares solúveis eucarióticas e proteínas procarióticas. Por não possuir núcleo, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, a *E. coli* sintetiza moléculas que não passam por modificações pós-traducionais como glicosilação, formação de pontes dissulfeto a depender da linhagem, fosforilação ou processo proteolítico e, portanto, as proteínas recombinantes que são sintetizadas no microrganismo podem ser inativas, o que representa uma desvantagem desse sistema. Outras desvantagens são genes com códons raros encontrados em humanos podem não estar presentes no microrganismo, formação de agregação intracelular, produção de polissacarídeos e degradação proteica devido à falta de proteases. As bactérias também estão sujeitas a estresse metabólico desse modo afetando negativamente a produção de proteínas recombinantes (Karbalei et al., 2020, Owczarek et al., 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019).

Sistemas de expressão que utilizam leveduras para produção de proteínas recombinantes tem as vantagens de fácil manuseio, crescimento rápido, facilidade de manipulação genética, algumas espécies já apresentam sequenciamento completo do genoma e habilidade de realizar modificações pós-traducionais que são importantes para proteínas eucarióticas e secretar as proteínas produzidas de forma eficiente. Devido às suas características de fermentação, a densidade de células produzidas e rendimento do sistema baseado em leveduras são altos (Burcu Gunduz Ergun et al., 2019, Baghban et al., 2019).

As leveduras que costumam ser utilizadas nos sistemas de expressão são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) (Baghban et al., 2019).

S. cerevisiae é bastante utilizada na produção terapêutica para uso humano como por exemplo em vacinas contra hepatite B e contra o papilomavírus humano, além de não ser patogênica (Karbalei et al., 2020). No entanto, devido a expressão exacerbada de proteína recombinante ocorre acúmulo intracelular levando a uma redução dos produtos gerados e estresse celular. Proteínas expressadas em *S. cerevisiae* frequentemente sofrem de N e O-hiperglicosilação, outras limitações incluem baixo rendimento e instabilidade do plasmídeo (Baghban et al., 2019, Karbalei et al., 2020).

Com a utilização de *P. pastoris*, é possível secretar proteínas devidamente dobradas e funcionais, porém a N-glicosilação é diferente daquelas observadas em organismos eucariotos superiores (Tripathi e Shrivastava, 2019). O sistema que utiliza *P. pastoris* tem como desvantagem a degradação proteolítica dos produtos gerados o que resulta em um rendimento reduzido e perda da atividade biológica (Tripathi e Shrivastava, 2019). Ademais, por se tratar de uma levedura metilotrófica representa um obstáculo na sua cultivo por causa do risco de armazenar grandes quantidades de metanol (Baghban et al., 2019, Karbalei et al., 2020, Tripathi e Shrivastava, 2019).

Comparando os sistemas que usam *S. cerevisiae* e *P. pastoris* é notado que *P. pastoris* possui secreção de proteínas recombinantes mais eficiente (Baghban et al., 2019, Türkanoğlu Özçelik et al., 2019).

As linhagens de células de mamíferos precisam de um crescimento e meio de produção muito mais complexos em comparação com sistemas que utilizam bactérias ou leveduras (Karbalei et al., 2020, Puetz e Wurm, 2019). Os sistemas de expressão que utilizam células de mamíferos têm vantagem sobre outros sistemas pois produzem proteínas maiores e complexas, além de produzirem padrões de glicosilação semelhantes ao de humanos, modificações pós-traducionais e dobramento de proteínas adequados (Karbalei et al., 2020, Tripathi e Shrivastava, 2019). Porém, tem como desvantagens, crescimento lento, pode ocorrer contaminação com vírus animais o que limita seu uso em escala industrial e há dificuldade para formular um meio de cultura adequado pois é necessário diversos componentes para o crescimento ideal, fator esse que eleva os custos de produção (Owczarek et al., 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019).

As principais linhagens celulares utilizadas para expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos são CHO (*Chinese hamster ovary*), NS0 e Sp2/0 (*Mouse-derived myeloma*) (Tripathi e Shrivastava, 2019, Karbalei et al., 2020). Por meio desse sistema é possível obter enzimas, anticorpos monoclonais, fatores coagulantes, hormônios e citocinas (Karbalei et al., 2020, Owczarek et al., 2019). Para inserir o gene de interesse nas células de mamíferos há dois possíveis métodos de transporte: o primeiro envolve infecção viral e o segundo não necessita do uso de vetores, o DNA heterólogo é introduzido diretamente através de microinjeção e técnicas de eletroporação (Owczarek et al., 2019).

Algumas outras características vantajosas desse sistema são a possibilidade de secreção de proteínas heterólogas por lise celular, alta tolerância há mudanças de temperatura, oxigênio, pH e pressão durante a produção (Owczarek et al., 2019).

O processo para a síntese de proteínas recombinantes em células de inseto é possível devido ao desenvolvimento do BEVS (*baculovirus expression*

vector system) e envolve dois estágios. Primeiro, as células de insetos são multiplicadas para que a concentração desejada seja alcançada e infectadas com baculovírus contendo a sequência genômica de interesse, por isso a célula tem que ser susceptível a infecção pelo baculovírus e as linhagens usuais se originam de *Spodoptera frugiperda*, *Drosophila melanogaster* e *Autographa californica*. Esse sistema tem como vantagem um crescimento mais rápido e maior densidade celular em comparação com células de mamíferos, não há risco de contaminação por prions e DNA oncogênico e tem um alto rendimento. Apesar de formar pontes de dissulfeto e clivar peptídeos, modificações pós-traducionais mais complexas não são realizadas, o que representa uma desvantagem do sistema de expressão. Isso se dá por causa dos diferentes padrões de glicosilação já que células de insetos não performam N-glicosilação. Além disso, se trata de um sistema com alto custo-benefício (Owczarek et al., 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019).

Em animais transgênicos a produção de proteínas recombinantes ocorre de duas principais maneiras, seja por meio do leite de mamíferos transgênicos ou de ovos de galinhas transgênicas, que tem sido utilizada para a obtenção de anticorpos monoclonais, vacinas, citocinas, hormônios, enzimas, fatores de crescimento, fibrinogênio e colágeno (Owczarek et al., 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019).

O objetivo desse sistema de expressão é conseguir que o animal transgênico tenha integrado a proteína recombinante no seu genoma e seja capaz de passar o gene codificante adiante para seus descendentes, isso pode ser alcançado por meio da inserção da sequência transgênica em regiões pobres em genes por microinjeção no pronúcleo de zigoto masculino ou pela injeção do núcleo “somático” no oócito sem o seu próprio núcleo. Esse sistema de expressão tem como vantagem a secreção natural assim como modificações pós-traducionais, e como desvantagem pode ocorrer ativação da resposta imune se a modificação pós-traducional não for normalmente realizada pelo hospedeiro do sistema. Outro fator importante é a questão ética já que a depender da proteína de interesse a ser produzida a saúde do animal transgênico pode ser afetada (Owczarek et al., 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019).

As principais estratégias para a produção de proteínas recombinantes em plantas são cultura de células, sistemas baseados em tecidos vegetais e a construção de plantas transgênicas (Owczarek et al., 2019). Em plantas transgênicas, o transgene é introduzido nas células da planta por infecção bacteriana ou viral (Owczarek et al., 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019). Esse sistema de expressão é capaz de produzir agentes imunoterápicos voltados para o tratamento de câncer. Apesar de proteínas terapêuticas humanas produzidas em plantas transgênicas exibirem um padrão diferente daquele observados em humanos, há estratégias de bioengenharia para contornar esse problema (Tripathi e Shrivastava, 2019).

O sistema de expressão que utiliza plantas transgênicas tem como vantagens baixo custo, segurança já que há baixo risco de contaminação por patógenos animais, estabilidade, presença de metabólitos, insensibilidade há pequenas mudanças de pH e temperatura assim como habilidade de produzir proteínas glicosiladas (Owczarek et al., 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019). As desvantagens desse sistema incluem a utilização de pesticidas, herbicidas e contaminação por metabólitos tóxicos, deve ser levado em consideração como uma desvantagem do sistema a dificuldade de controlar o nível de expressão do gene assim como um processo de purificação complexo (Owczarek et al., 2019, Tripathi e Shrivastava, 2019).

Uma comparação entre as vantagens e desvantagens dos sistemas de expressão de proteína recombinante abordados nesse tópico é exibida na Tabela 1.

Tabela 1 — Comparação entre as vantagens e desvantagens dos sistemas de expressão.

Sistema de Expressão	Vantagens	Desvantagens
-----------------------------	------------------	---------------------

Bactéria (<i>E. coli</i>)	Baixo custo, rápido crescimento, médio rendimento, facilidade de manuseio.	Falta de modificações pós-traducionais, dificuldades no dobramento de proteínas, presença de inclusões, possibilidade de contaminação por endotoxinas.
Leveduras	Fácil manuseio, crescimento rápido, facilidade de manipulação.	Acúmulo intracelular devido a produção exacerbada, baixo rendimento, instabilidade do plasmídeo, glicosilação diferente da apresentada em eucariotos superiores, degradação proteolítica.
Protozoário (<i>L. tarentolae</i>)	Baixo custo, não há risco de contaminação, padrão de glicosilação semelhante ao de humanos, não patogênico, fácil cultivo, alta densidade celular, alto rendimento.	Baixo rendimento em comparação com células de mamíferos, falta de ácidos siálicos, falta de mais informações sobre o protozoário.
Células de inseto	Crescimento rápido, alta densidade celular, não há risco de contaminação.	Não realiza modificações pós-traducionais mais complexas, alto custo, dificuldade de cultivo.
Células de mamíferos	Produção de proteínas maiores e mais complexas, padrões de glicosilação semelhante ao de humanos.	Crescimento e meio de produção muito mais complexos, crescimento lento, risco de contaminação viral, alto custo.
Animais transgênicos	Secreção natural, modificações pós-traducionais.	Possibilidade de ativação da resposta imune, questões éticas, possibilidade de contaminação da cultura, alto custo.

Plantas transgênicas	Baixo custo de produção, alto rendimento, baixo risco de contaminação, glicosilação.	Alto custo de purificação, metabólitos tóxicos, controle da expressão do transgene.
----------------------	--	---

Fonte: Adaptado de Lai et al. (2019)

2.3 VACINAS

Vacinas são importantes e vitais ferramentas na prevenção de doenças e em saúde pública, mas seu desenvolvimento enfrenta vários obstáculos. Alguns vírus estão sempre mudando, o que torna difícil conseguir uma boa cobertura vacinal. Além disso, muitos fatores influenciam na eficácia das vacinas, como: gênero, idade, condições médicas existentes e variações genéticas (Brisse et al., 2020, Maruggi et al., 2019, Rosa et al., 2021).

A principal diferença entre vacinas profiláticas e terapêuticas é que ao invés de neutralizar os anticorpos como as vacinas profiláticas, as vacinas terapêuticas buscam gerar imunidade mediada por células. Outrossim, existe a possibilidade de aliar o uso de vacinas profiláticas e vacinas terapêuticas ou até mesmo utilizar vacinas profiláticas como terapêutica no combate às doenças (Garbuglia et al., 2020). Tradicionalmente, vacinas são utilizadas para a prevenção de doenças, as vacinas profiláticas simulam uma resposta imune semelhante àquelas que ocorrem contra patógenos e induzem a ativação de células T e a produção de anticorpos enquanto vacinas terapêuticas têm como alvo antígenos próprios que devem induzir uma resposta dos anticorpos sem ativar resposta citotóxica das células T. De forma simples, a ativação de células T autoimunes deve ser bloqueada mantendo a ativação apenas de células B auto imunes. Além de que, a vacinação terapêutica ocorre quando a doença está bem estabelecida seja para melhorar a condição, diminuir o tempo de duração do tratamento ou prevenir uma recaída (Nakamaru et al., 2020, Bouzeyen e Javid, 2022, Li et al., 2023). Além disso, podem ser divididas de acordo com a classificação da doença podendo ser vacinas que têm como alvo tumores, vacinas para doenças infecciosas e vacinas contra doenças crônicas (Li et al.,

2023). Enquanto, as vacinas profiláticas são administradas geralmente em indivíduos não infectados (Nakamaru et al., 2020, Bouzeyen e Javid, 2022, Li et al., 2023).

Diversos tipos de vacinas têm sido desenvolvidos utilizando plataformas e métodos já bem estabelecidos. Nas vacinas conjugadas, um exemplar desse tipo de vacina seria a utilização de um açúcar específico da superfície bacteriana conjugado de forma covalente há um toxóide (uma toxina patogênica modificada para não ser mais tóxica, mas se manter antigênica). Outro tipo de vacina são as de que utilizam microrganismos atenuados ou inativados, para que ocorra a atenuação, o microrganismo é passado várias vezes em cultura de células não habituais até ter seu potencial infeccioso enfraquecido para humanos, já a inativação é feita quimicamente ou utilizando altas temperaturas, tornando-o não replicante. Na plataforma atenuada há o risco de ocorrer a reversão para uma forma altamente patogênica enquanto na inativada pode não ser imunogênica o suficiente ou até mesmo levar a um quadro patológico aprimorado da doença. Apesar de induzir resposta imune por um período prolongado, devido ao seu risco de reversão, vacinas atenuadas não são indicadas contra variantes altamente patogênicas. Outras desvantagens desse tipo de vacina são o prazo de validade curto, baixa estabilidade térmica e a exigência de condições rigorosas de armazenamento e transporte (Brisse et al., 2020, Kayser e Ramzan, 2021, Li et al., 2023).

Recentemente com o avanço biotecnológico novas plataformas vacinais têm surgido. Alguns exemplos são vacinas baseadas em ácidos nucleicos (DNA ou RNA), formação de complexos de nanopartículas e vacinas baseadas em vetores virais. Essas vacinas têm potencial para serem produzidas rapidamente e de forma flexível (Brisse et al., 2020, Kayser e Ramzan, 2021, Maruggi et al., 2019).

Vacinas baseadas em RNA têm tido êxito, como pode ser observado recentemente nas vacinas desenvolvidas contra a COVID-19, indicando um grande potencial contra doenças infecciosas emergentes (Brisse et al., 2020). Essas vacinas têm um bom custo-benefício e são fáceis de se criar e produzir. O

processo de fabricação dessas vacinas não depende do antígeno codificado, assim diferentes vacinas podem ser produzidas e purificadas na mesma plataforma se forem baseadas no mesmo ácido nucleico (Maruggi et al., 2019). Apesar de terem a vantagem de ser estável, vacinas de DNA induzem uma fraca resposta imune em humanos e animais grandes em contraste com sua comprovada eficácia *in vitro* e em modelos animais pequenos (Brisse et al., 2020). Uma hipótese é que a via intramuscular tem uma população de APC (*Antigen-Presenting Cell*) relativamente baixa e apresentação de antígeno principalmente por MHC-I (Complexo de histocompatibilidade principal classe I), alguns mecanismos têm sido estudados para contornar esse problema como administração intradermal com nanopartículas de ouro ou eletroporação *in vivo*. Vacinas de DNA contêm DNA plasmidial codificando o antígeno desejado que será transcrito em mRNA e então traduzido em proteínas que irão induzir resposta imune específica contra aquele antígeno. A partir desta, espera-se que haja a indução de resposta imune humoral e celular, e também ocorra a estimulação de receptores *toll-like* (TLR) que leva a uma cascata de resposta pró-inflamatória com produção de citocinas. As vacinas que utilizam mRNA são mais instáveis que as vacinas de DNA, mas sua eficácia pode ser aumentada purificando o mRNA e com a adição de sequências 5' Kozak e cap, sequências 3' poly-A e nucleotídeos modificados que aumentam a estabilidade e diminuem a detecção por receptores do sistema imune inato. Quando otimizadas, as vacinas de RNA podem ser mais imunogênicas do que vacinas de DNA além de não oferecerem o risco de integração genômica aleatória. Ademais, vacinas de mRNA são precisas e expressam apenas o antígeno específico induzindo uma resposta imune direta promovendo tanto uma resposta humoral quanto celular. Quanto à produção, é baseada em uma reação de transcrição *in vitro cell-free* minimizando assim o risco de impurezas e contaminação viral (Kayser e Ramzan, 2021, Rosa et al., 2021, Sobhani et al., 2022).

Em vacinas de vetores virais o antígeno do vírus-alvo é incorporado em um vírus não patogênico, a maior vantagem desse sistema é a forte resposta imune adaptativa e inata gerada na ausência de adjuvantes pois ocorre expressão de diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), mas há preocupação com a possível reversão do vírus atenuado principalmente utilizando

um vetor replicante. A habilidade de expressar antígenos heterólogos e induzir respostas tanto humoral quanto celular é a maior vantagem desse tipo de vacina. Além disso, é capaz de apresentar antígenos para células específicas ou tecidos. Em vacinas de vetores virais é possível replicar o processo de infecção de patógenos específicos de forma natural o que desencadeia uma inflamação aguda clássica e detecção imune através da produção de PAMPs. Diversas vacinas profiláticas entraram em testes clínicos de fase III ou já foram aprovadas, como por exemplo vacinas contra SARS-CoV-2 e ebola (Brisse et al., 2020, Wang et al., 2023).

Vacinas de subunidades tem como vantagem a segurança por entregar o antígeno como proteína purificada ao invés do patógeno completo, mas a desvantagem é que são menos imunogênicas assim necessitando de adjuvantes e doses repetidas. Algumas estratégias têm sido aplicadas para contornar esse problema como vacinas *virus-like particles* (VLPs) e vacinas de nanopartículas (NP). As VLPs utilizam plataformas capazes de produzir partículas semelhantes às estruturas do vírus em questão, e podem ser produzidas através de sistemas de expressão procariotos ou eucariotos. Por não conter genoma viral não conseguem se replicar nas células oferecendo assim um nível maior de segurança. Uma outra vantagem é que a resposta imune ativada é completa, portanto, sendo altamente imunogênicas e estimulam uma resposta celular e humoral robusta (Brisse et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Revisar e discutir criticamente as possíveis aplicações da *Leishmania tarentolae* como plataforma para o desenvolvimento de vacinas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar e distinguir os diferentes sistemas de expressão;
- Analisar os principais parâmetros e condições para utilização biotecnologia da *L. tarentolae*;
 - Avaliar o uso da *L. tarentolae* na profilaxia;
 - Avaliar o uso da *L. tarentolae* na terapêutica;
 - Identificar e avaliar os principais estudos pré-clínicos das vacinas produzidas a partir de *L. tarentolae*;
- Discutir sobre as perspectivas de utilização da *L. tarentolae*;

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE PESQUISA

O trabalho executado se trata de uma revisão sistemática e transversal da literatura por meio da pesquisa bibliográfica de artigos científicos obtidos por meios eletrônicos em base de dados científicos.

4.2 PLATAFORMAS DE PESQUISA

Foram utilizados como fontes de busca para esta revisão de literatura artigos científicos obtidos por meio das bases de dados: *Scielo*, *PubMed*, *Science Direct* e *Google Scholar*. Os artigos foram selecionados e organizados utilizando o *software Zotero* como suporte.

4.3 ESTRATÉGIAS DE BUSCA

Para todos os bancos de dados, foram utilizados os seguintes descritores: “*Leishmania tarentolae*”, “*vaccine*”; “*protein expression*”; “*heterologous system*”; “*immunotherapy*”. Os critérios de busca foram feitos no idioma inglês nos bancos de dados mencionados no item 4.2. Os descritores foram organizados de acordo com os operadores booleanos “AND” e “OR”, onde os descritores deveriam estar presentes no título, corpo do resumo ou nas palavras chaves. Adaptações foram realizadas de acordo com o banco de dados para ampliação da busca e para obtenção de melhores resultados.

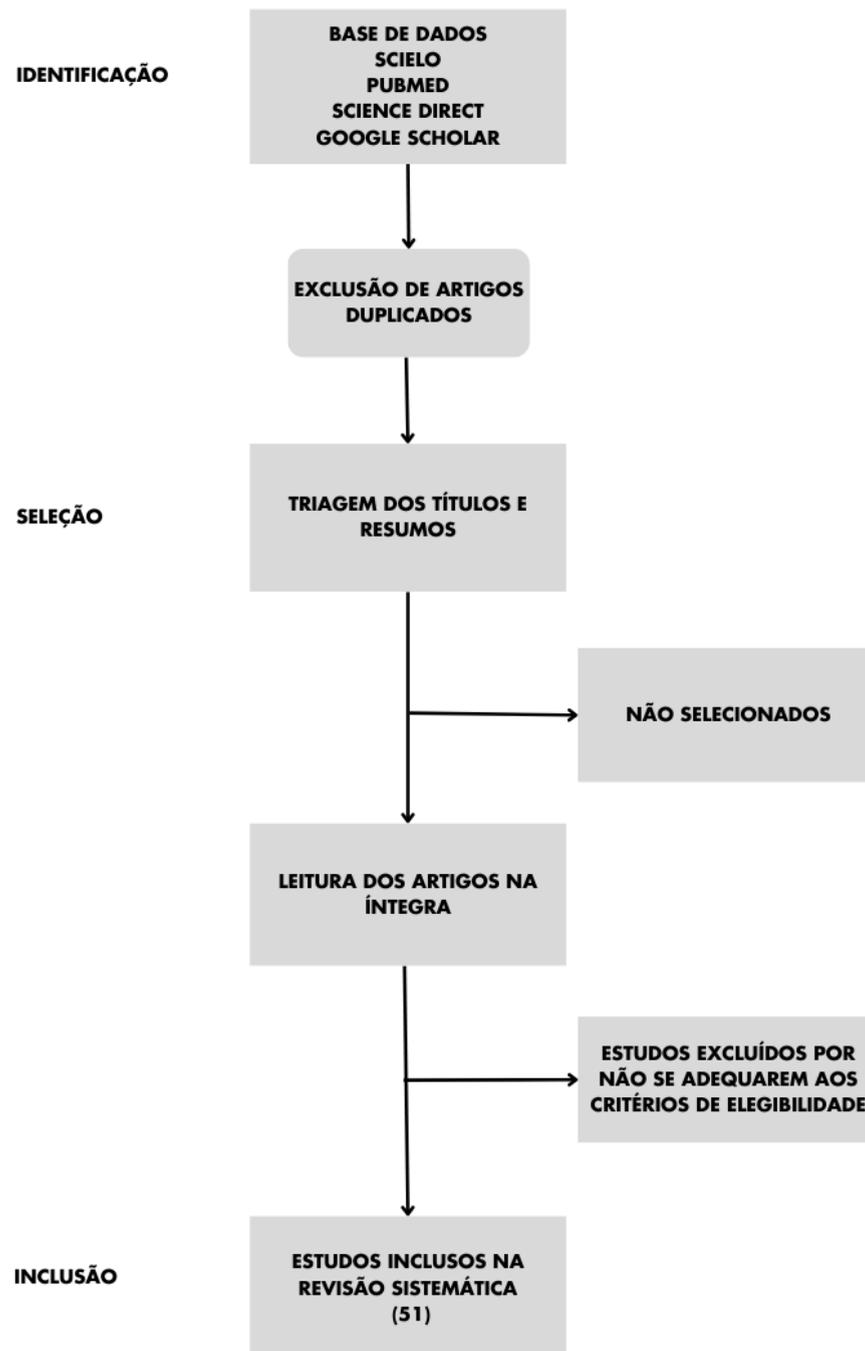
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos artigos publicados entre os anos de 2019 e 2023, com ressalva ao período para aqueles pioneiros na área e artigos relevantes a serem mencionados acerca do tema. Como critério de exclusão, foram desconsiderados as teses, dissertações, trabalhos de conclusão de curso, os artigos duplicados, resumos publicados em eventos científicos e artigos que não apresentaram relevância a temática do estudo.

4.5 ORGANIZAÇÃO DOS ARTIGOS SELECIONADOS

Os dados dos artigos foram adicionados no *software Zotero* com a finalidade de facilitar as buscas, a triagem e a seleção no decorrer da escrita do projeto.

Figura 4 - Fluxograma de triagem e seleção dos estudos.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS, VETORES E CONDIÇÕES DE USO E CULTIVO

As cepas de *L. tarentolae* são consideradas nível de biossegurança 1, portanto não precisando de requisitos especiais para manipulação em laboratório (Klatt et al., 2019, Ferrer et al., 2019). Sendo assim, *L. tarentolae* é um protozoário seguro para se trabalhar (Mendoza-Roldan et al., 2022, Klatt et al., 2019).

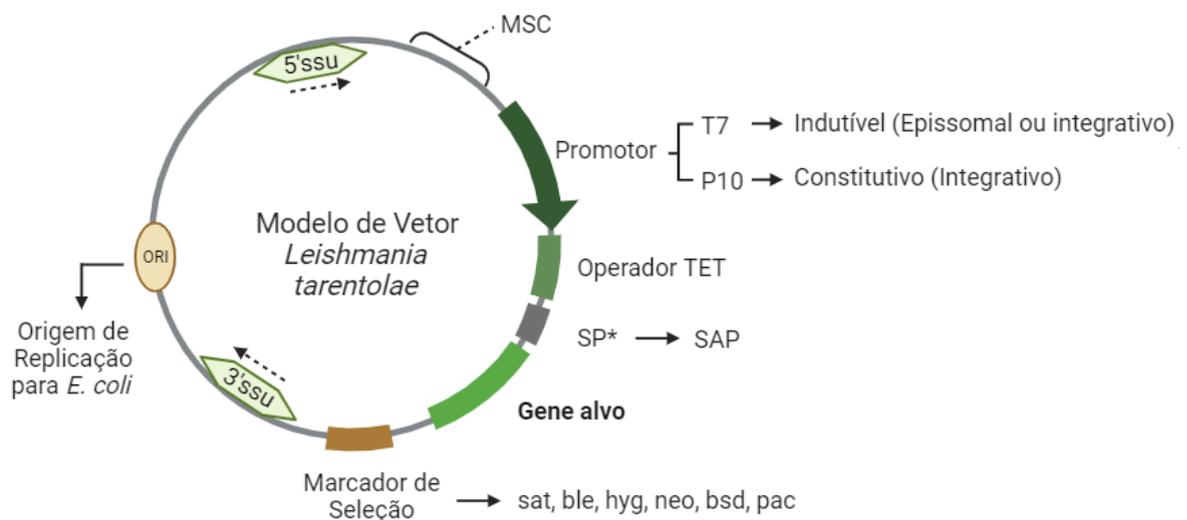
Atualmente, existe um sistema de expressão utilizando *L. tarentolae* comercializado pela *Jena Bioscience* chamado de LEXSY®. O sistema é composto por um vetor de expressão (pLEXSY) e uma cepa geneticamente modificada de *L. tarentolae* (T7-TR) (Ferrer et al., 2019). Esse sistema de expressão pode ser utilizado tanto para expressão intracelular quanto para secreção de proteínas através de promotores constitutivos (integrados ao genoma) ou de indução (integrado ao genoma ou epissomal) (Bandi et al., 2023, Lai et al., 2019). A cepa P10 na qual o sistema LEXSY é baseado, se deriva da cepa TARI/UC do protozoário isolada de *T. mauritanica* (Mendoza-Roldan et al., 2022, Klatt et al., 2019).

Em representação básica do vetor (Figura 5), o gene de interesse estará sob o controle do promotor, que a depender da cepa poderá ser T7 ou P10. Para *L. tarentolae* T7-TR expressar em sistema epissomal, a RNA polimerase do bacteriófago T7 (T7 RNA pol) atuará na transcrição da sequência alvo sendo sucedido por um operador de tetraciclina (TET) que é alvo da proteína repressora TET (TR) que atua inibindo a transcrição (Ferrer et al., 2019). Assim, a expressão de proteínas recombinantes é induzida pela adição de tetraciclina no meio de cultura (Zimna et al., 2023, Ferrer et al., 2019). Já para cepa P10, que é expressa constitutivamente, o gene alvo é inserido integrativamente para recombinação homóloga no locus 18S da subunidade do DNA ribossômico (ssu), onde o gene é flanqueado por duas subunidades do rRNA (5' e 3'ssu). Nesse sistema a transcrição é controlada pela RNA polimerase I da célula hospedeira (Oliveira et al., 2019). O plasmídeo pode ser introduzido nas células através de métodos

químicos ou físicos (Stutz, 2023), no sistema de expressão que utiliza *L. tarentolae* os plasmídeos construídos são amplificados em *E. coli* e introduzidos por eletroporação no parasita na forma promastigota (De Oliveira et al., 2019).

Apenas a *Jena Bioscience* oferece produtos comerciais para o LEXSY, como um sistema epissomal e um sistema integrativo-constitutivo. Para a estratégia de expressão extracelular, utiliza-se vetores específicos contendo um peptídeo sinal (SP) que normalmente compreende aqueles adicionados da sequência referente a fosfatase ácida secretada (SAP) oriunda da *L. mexicana*. Cassetes de expressão podem ser escolhidos entre vários vetores que podem ser transferidos por eletroporação e selecionados utilizando genes de resistência para antibióticos presentes na sequência, como: estreptotricina acetiltransferase (sat), proteína de ligação à bleomicina (ble), higromicina fosfotransferase (hyg), aminoglicosídeo fosfotransferase (neo), puromicina acetiltransferase (pac) e blasticidina (bsd). (De Oliveira et al, 2019).

Figura 5 - Representação esquemática do vetor para *Leishmania tarentolae*. ORI: Origem de replicação; MSC: Múltiplos sítios de clonagem; TET: Tetraciclina; SP: Peptídeo sinal; SAP: Fosfatase ácida secretada; ble: bleomicina; hyg: higromicina fosfotransferase; neo: aminoglicosídeo fosfotransferase; pac: puromicina acetiltransferase; bsd: blasticidina.



*Sequência adicionada ao vetor para permitir o transporte extracelular da proteína alvo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Como mencionado anteriormente, as proteínas podem ser expressas tanto de forma intracelular quanto de forma extracelular (De Oliveira et al., 2019, Klatt et al., 2019). Quando ocorre expressão extracelular o baixo nível de secreção de proteínas endógenas facilita o processo de purificação da proteína recombinante já que a maioria se encontra presente no meio (De Oliveira et al., 2019).

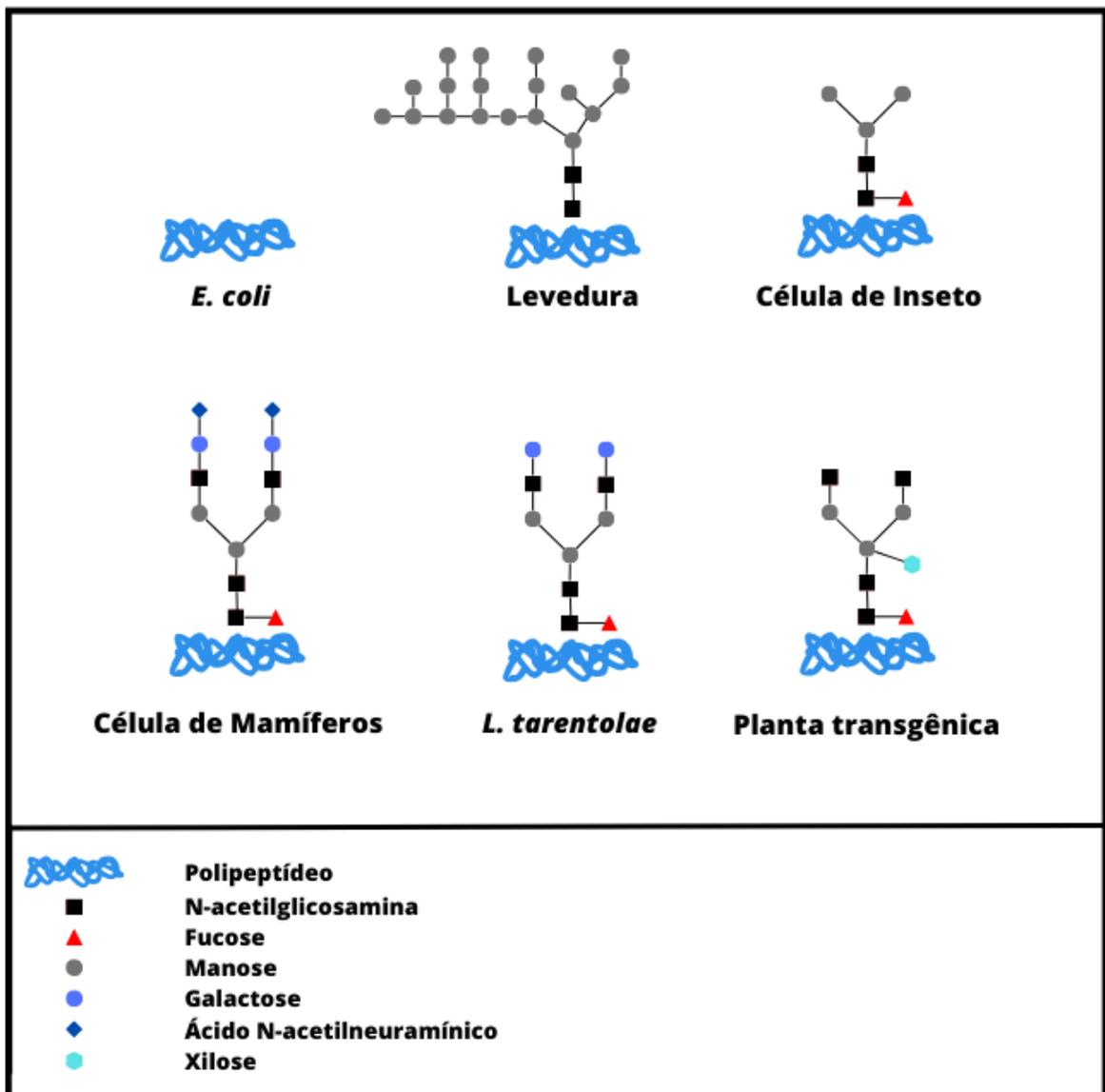
O sistema de expressão que utiliza *L. tarentolae* tem manutenção e crescimento a um baixo custo, o que o torna atrativo em comparação com sistemas de expressão que utilizam células de mamíferos ou células de inseto. As formas promastigotas são fáceis de cultivar em condições aeróbicas a 26°C em meios de culturas simples (Kahaki et al., 2020, Mendoza-Roldan et al., 2022). Normalmente, o cultivo ocorre em meios nutritivos acrescido de BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina (De Oliveira et al., 2019), uma porfirina que contém ferro que aumenta a proliferação celular, regula as vias metabólicas de respiração e a síntese proteica (Lai et al., 2019). Além disso, não necessita de suplementação com soro animal para atingir alta densidade celular podendo ser utilizado extrato de levedura (Ferrer et al., 2019, Kahaki et al., 2020). Dessa forma, o protozoário é ideal para a produção em larga escala utilizando biofábricas para seu crescimento, além de ter alto rendimento (Klatt et al., 2019, Mendoza-Roldan et al., 2022).

L. tarentolae é encontrado na forma promastigota na cultura celular. Nessa forma, elas são monoflageladas com tamanho de 4–12 µm e largura de 0.5–3 µm, as amastigotas são menores e arredondadas com flagelo rudimentar (Klatt et al., 2019, Lai et al., 2019). A divisão das promastigotas ocorre por fissão a cada 4-6 horas e o crescimento depende do suprimento de oxigênio (Klatt et al., 2019).

A maior vantagem do sistema de expressão utilizando *L. tarentolae* é combinar rápida proliferação e modificações pós-traducionais tendo as características de sistemas procariotos e eucariotos sem as desvantagens de hiperglicosilação observadas em leveduras e contaminação com endotoxinas em sistema que utilizam bactérias (De Oliveira et al., 2019). O padrão de glicosilação da *L. tarentolae* além de ser similar ao de mamíferos muito provavelmente é similar ao de espécies patogênicas da família Trypanosomatidae

(Mendoza-Roldan et al., 2022). Essas características específicas fazem com que a *L. tarentolae* seja ideal para o estudo de proteínas e produção de antígenos proteicos que podem ser utilizados para o desenvolvimento de vacinas e aplicações em diagnósticos. Na figura 6 é demonstrado o padrão de glicosilação em diferentes sistemas de expressão (Klatt et al., 2019, Mendoza-Roldan et al., 2022).

Figura 6 - Representação dos padrões de glicosilação em diferentes sistemas de expressão.



Fonte: Adaptado de Lai et al. (2019).

No caso da cultura de *L. tarentolae* o risco de contaminação viral, que é uma das limitações da utilização de células de mamíferos, não foi evidenciado e a

transmissão de infecções virais de humanos para células de *Leishmania* é improvável (Varotto-Boccazzi et al., 2021).

Atualmente, o protozoário já foi utilizado para o diagnóstico experimental de antígenos para espécies patogênicas de *Leishmania* e *Trypanosoma*, assim como para diagnóstico viral, um exemplo é o estudo realizado por Varotto-Boccazzi e colaboradores (2022) no qual uma proteína recombinante, a proteína spike, produzida por *L. tarentolae* foi utilizada para o diagnóstico sorológico de infecção por SARS-CoV-2 (Mendoza-Roldan et al., 2022).

No entanto, para a cultivo prolongado de *L. tarentolae* é necessário que seja feita seletividade para que o protozoário continue seu ciclo de vida completo e não ocorra deriva genética. Ao longo do tempo na cultura contínua, ocorrem mudanças no kDNA da *L. tarentolae* o que pode acarretar na perda de proteínas não necessárias para o crescimento das células (Klatt et al., 2019).

O rendimento proteico da *L. tarentolae* no LEXSY tem uma média de 0.1-30 mg/L podendo ser aumentado até atingir um rendimento de 500 mg/L, segundo a *Jena Bioscience*. Porém, esse rendimento ainda é muito menor se comparado com os rendimentos de outros sistemas de expressão de células de mamíferos, mas é esperado que esse rendimento da expressão proteica de *L. tarentolae* aumente consideravelmente nos próximos anos (Klatt et al., 2019).

A maioria dos sistemas de expressão eucariotos tem produção de proteínas mediada pela RNA polimerase II (Pol II) que faz a transcrição do gene heterólogo e é altamente regulada, a expressão abundante de proteínas e a atividade da RNA Pol II resulta em *downregulation* da Pol II levando assim a um baixo rendimento na expressão de proteínas (Attarpour Yazdi et al., 2019, Lai et al., 2019). Portanto, se faz necessário um sistema de expressão que não possua essa limitação. Desse modo, *L. tarentolae* por fazer parte da ordem Trypanosomatidae não tem a transcrição acoplada ao processamento do RNA assim contornando esse problema (Attarpour Yazdi et al., 2019). O cassete de expressão é inserido no locus *ssu* no sistema constitutivo sendo transcrito pela RNA polimerase I, esse locus se trata de um locus repetitivo no genoma da *L.*

tarentolae ou no locus ornitina descarboxilase (*odc*) no sistema integrativo-induzível sendo transcrito pela RNA polimerase II. Na transcrição em *Leishmania* (inclusive em *L. tarentolae*) não há íntrons e, portanto, não há reações de *cis-splicing* assim a transcrição é policistrônica. Já o processo pós-traducional do pré-mRNA é afetado por *trans-splicing* e poliadenilação nas regiões intergênicas dessa forma a regulação da expressão de proteínas pode ser influenciada pela estruturas da regiões intergênicas (Klatt et al., 2019).

5.2 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *L. TARENTOLAE*

Quando utilizadas para o diagnóstico sorológico, proteínas recombinantes são produzidas usando DNA recombinante assim obtendo o antígeno desejado. Os diversos sistemas de expressão tais como leveduras e células de inseto podem ser aplicados para a produção, mas o ideal é que sejam utilizadas células de mamíferos já que apresentam uma melhor performance devido ao padrão de glicosilação semelhante ao de humanos (Varotto-Boccazzi et al., 2021).

O sistema utilizando *L. tarentolae* foi utilizado com sucesso para a produção da proteína recombinante Lbk39 com o intuito de realizar o diagnóstico sorológico de infecção por *Leishmania* em humanos com leishmaniose visceral e cutânea. A sequência foi baseada em *Leishmania braziliensis* e demonstrou 88% de sensibilidade e 98% de especificidade em pacientes com leishmaniose cutânea enquanto foi observado 98% de sensibilidade e 100% de especificidade em pacientes com leishmaniose visceral (Moraes et al., 2019).

Para a produção de proteínas é possível aplicar diversas estratégias para aumentar o rendimento obtido, como a otimização de códon e aumentar o número de cópias do gene de interesse. O sistema LEXSY já demonstrou ser capaz de produzir enzimas, proteínas citoplasmáticas, proteínas nucleares, proteínas virais e anticorpos (Tabela 2) demonstrando assim seu potencial e as diversas áreas em que pode ser aplicado (De Oliveira et al., 2019).

Tabela 2 — Exemplos de proteínas recombinantes expressas em *L. tarentolae*.

Proteínas recombinantes	Quantidade (mg/L)
Eritropoetina	-
LM-332	0.5
IFN, Interferon	9,5
tPA, ativador do plasminogenio tecidual	0.17
T7 RNA polimerase	1
HIV-1, vírus da imunodeficiencia humana 1	-
LOB7 scFv, anticorpo de cadeia única	2.95
PpSP15, proteína de salivar de <i>Phlebotomus papatasi</i>	In vivo
VLPs, viral like particles	4

Fonte: Adaptado de De Oliveira et al. 2019.

L. tarentolae pode ser utilizado para a produção de vacinas VLP, um exemplo é uma potencial vacina contra NoV baseada na proteína do capsídeo

(VP1) da cepa pandêmica do vírus, norovírus são compostos principalmente da proteína estrutural VP1, dessa forma uma sequência completa desta proteína foi otimizada para ser expressa em *L. tarentolae* com o objetivo de expressar NoV VLPs no protozoário. Por meio da imunofluorescência foi confirmado um nível alto de proteínas do capsídeo do NoV localizadas principalmente no citoplasma das células de *L. tarentolae*, também foi performedo ELISA que indicou o reconhecimento das proteínas do capsídeo de NoV expressadas pelo protozoário por anticorpos. Ademais, foi confirmado que as proteínas recombinantes estavam dobradas e conformadas de maneira adequada. Uma baixa concentração de VLPs induziu uma forte resposta imune humoral em camundongos vacinados também estimulando a produção de anticorpos neutralizantes. Para demonstrar a imunogenicidade, camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea com frações contendo VLPs do NoV (Panasiuk et al., 2021).

Outro estudo apresenta uma vacina contra TBEV (*Tick-borne Encephalitis virus*) produzindo VLPs utilizando *L. tarentolae* foi testada em camundongos demonstrando segurança e eficácia. Foi possível obter alta eficiência assim como uma alta secreção de partículas no meio de cultura. Além disso, foi demonstrado um forte potencial imunogênico da vacina (Zimna et al., 2023).

5.3 PROFILAXIA E TRATAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS UTILIZANDO *L. TARENTOLAE*

5.3.1 Uso Como Vacina Viva

L. tarentolae é capaz de subverter a resposta imune a seu favor, ao se tornar alvo das células dendríticas e macrófagos o parasita não é inativado ou destruído ao invés é capaz de sobreviver e replicar por isso o protozoário poderia ser aplicado como plataforma vacinal ou veículo para produzir e entregar antígenos. O microrganismo também pode ser explorado para desenvolver vacinas contra leishmanioses humanas e caninas devido a reatividade cruzada imunológica ou ser modificado para expressar antígenos de outras espécies patogênicas (Bandi et al., 2023).

Outros microrganismos já foram utilizados como patógeno substituto, portanto, há exemplos de vacinas que utilizam microrganismos que infectam animais e não são patogênicos para humanos como plataforma de vacinas. Sendo assim, é possível que *L. tarentolae* atue como um patógeno substituto e é um candidato apropriado para ser utilizado como vacina viva (Bandi et al., 2023).

Uma característica que torna possível o uso de *L. tarentolae* como vacina viva é que ao ser inoculada em tecidos de mamíferos é esperado que a forma promastigota tenha como alvo células apresentadoras de antígenos, como por exemplo, células dendríticas e outras células fagocíticas como macrófagos. (Varotto-Boccazzi et al., 2021, Shokouhy et al., 2022, Mendoza-Roldan et al., 2022). *L. tarentolae* também pode ter como alvo órgãos linfóides secundários assim induzindo resposta Th1 e a produção de IFN- γ (Shokouhy et al., 2022, Ansari et al., 2019). Essas características do protozoário induzem uma forte resposta imune tanto de células T CD4+ quanto T CD8+ e o fato de ter como alvo APCs pode aumentar a apresentação de antígenos através do complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC I) e do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (Ansari et al., 2019). Apesar disso, a sobrevivência e propagação de *L. tarentolae* em células de mamíferos é limitada (Mendoza-Roldan et al., 2022).

O protozoário já foi utilizado como plataforma de entrega de antígenos anti-viral contra oito diferentes tipos de vírus, como por exemplo HIV (*human immunodeficiency virus*), HPV (*human papillomavirus*), HBV (*hepatitis B virus*), HCV (*hepatitis C virus*), NoV (*norovirus*) e SARS-CoV-2 (Varotto-Boccazzi et al., 2021). *L. tarentolae* foi usado para a expressão e entrega de proteína Gag do HIV-1 em modelo murino produzindo resposta imune efetiva com produção de anticorpos neutralizantes (Varotto-Boccazzi et al., 2021). Contra o HPV também foi utilizado em modelo murino do tumor associado com esse vírus em um estudo pré-clínico resultando em um crescimento contido do tumor nos camundongos vacinados (Bandi et al., 2023). Também já foi aplicado para a produção de antígenos de HEV (*hepatite E virus*) (Varotto-Boccazzi et al., 2021).

No estudo de Salari e colaboradores (2020), antígenos de *Leishmania major*, KMP11 e LACK, na forma de construtos moleculares foram desenvolvidos no vetor pLEXY-neo 2.1 e clonados em *E. coli* Top10 para então serem transferidos para o genoma de *L. tarentolae* sendo aplicado como vacina contra *Leishmania major*. A vacinação foi realizada em camundongos BALB/c com parasitas na fase estacionária e foi aplicada na pata esquerda dos camundongos. Além de induzir resposta humoral, também verificou-se aumento na memória imune e ausência na formação de ulceração (Salari et al., 2020)

L. tarentolae foi aplicada como vacina contra *Leishmania donovani* induzindo resposta Th1 e aumentando a imunidade (Salari et al., 2020). Da mesma forma, o protozoário foi utilizado como vacina viva para a imunização de camundongos BALB/c contra a infecção por *Leishmania infantum*, nesse caso a proteína recombinante expressa foi o antígeno A2 de *Leishmania donovani* (Klatt et al., 2019).

Outro exemplo do protozoário como plataforma de entrega de vacinas é de uma cepa de *L. tarentolae* recombinante expressando antígenos do HCV. Que demonstrou ser imunogênica induzindo uma resposta a longo prazo. A resposta imune foi avaliada através do perfil de citocinas de Th1 e Th17. A atividade desses perfis de citocinas foi avaliada por 60 dias e resultou na produção de IFN- γ (Ansari et al., 2019).

Um exemplo do uso de *L. tarentolae* como vacina viva é a vacinação com *L. tarentolae*-PpSP15, um antígeno da saliva do flebotomíneo *Phlebotomus papatasi*, que conferiu imunidade contra *L. major* em camundongos BALB/c através da produção de IFN- γ e de IL-17 (Klatt et al., 2019, Salari et al., 2020).

Na saliva são secretadas certo número de proteínas com efeitos imunomodulatórios e alguns desses componentes são comprovadamente protetivos contra leishmania por induzir resposta de hipersensibilidade tardia com perfil Th1 (Lajevardi et al., 2022). No estudo de Lajevardi e colaboradores (2022), foi proposto a utilização de duas proteínas salivares: PpSP15 de *Phlebotomus papatasi* e PsSP9 de *Phlebotomus sergenti*. Foi utilizada a sequência do peptídeo

2A derivado do vírus para a entrega de ambas as proteínas. A junção de PpSP15-T2A-PsSP9 ativa apropriadamente uma resposta imune com produção de IFN- γ (Lajevardi et al., 2022).

L. tarentolae já foi utilizada como vetor em uma vacina contra antígenos de *Leishmania major*. O objetivo do estudo era desenvolver uma vacina derivada de um multiepitopo dos antígenos LACK, LeIF, GP63 e SMT. Entre os antígenos escolhidos LeIF é expresso tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota de todas as espécies de *Leishmania* sendo também um adjuvante natural para Th1, além disso é a única proteína de *Leishmania* capaz de induzir resposta Th1 através do mecanismo dependente de IL-12. O antígeno LACK também é expresso em ambas as formas e inicia a diferenciação de promastigotas em amastigotas nos macrófagos infectados. A GP63 induz produção de IFN- γ em LC enquanto a SMT participa da biossíntese de ergosterol. A imunização foi realizada em camundongos BALB/c e todos demonstraram imunidade parcial e maiores níveis de IFN- γ (Bavarsad Ahmadpour; Dalimi; Pirestani, 2022). Há vários benefícios em utilizar vacinas baseadas em vetores, como a síntese *de novo*, ativação da cascata clássica do complemento, aumento da atividade letal dos macrófagos, indução de resposta humoral específica, prevenção da ligação do parasita nos receptores do hospedeiro e indução de resposta T-citotóxica (Bavarsad Ahmadpour; Dalimi; Pirestani, 2022).

No estudo de Epis e colaboradores (2022), *L. tarentolae* foi proposta como veículo vacinal para a administração via mucosa da proteína spike do SARS-CoV-2, o microrganismo seria ideal para essa rota de administração por possibilitar a entrega pela via enteral. Essa rota de administração não convencional seria possível por ser resistente ao choque osmótico e a agressões químicas e físicas além disso o tamanho das formas promastigotas são semelhantes ao de partículas internalizadas pelas células M no intestino que estão envolvidas na transferência de antígenos do lúmen para fagócitos mononucleares. A imunização foi realizada em camundongos BALB/c com a *L. tarentolae* expressando a proteína spike completa e o domínio purificado RBD dessa proteína produzida por outro clone do protozoário, essa estratégia foi adotada para que o hospedeiro seja imunizado tanto com a subunidade do

antígeno quanto com a partícula microbial do antígeno. No primeiro experimento realizado no estudo, a resposta IgG sem adjuvantes foi limitada, mas foi possível obter as seguintes informações: independente das diferentes dosagens e combinações nenhum dos animais apresentou reações adversas, *L. tarentolae* tem potencial como plataforma vacinal já que houve geração de resposta IgG e administração subcutânea assim como intraperitoneal foram bem toleradas. Já no segundo experimento do estudo foram adicionados 3 adjuvantes: AddaVax, Alum, r848; InvivoGen, e além da subcutânea foi utilizada a rota de administração retal. Na presença de adjuvantes observou-se a soroconversão de alguns animais em diferentes grupos após a primeira dose de reforço (Epis et al., 2022).

5.3.2 Imunoterapia

Com as novas perspectivas no desenvolvimento de vacinas, além da rota tradicional de vacinas para a prevenção de doenças, uma abordagem possível seria a de vacinas para o tratamento de doenças (Brisse et al. 2020, Rosa et al., 2021). A utilização de vacinas contra o câncer vem crescendo nos últimos anos como uma alternativa aos métodos tradicionais de tratamento e algumas plataformas vacinais já estão sendo avaliadas (Panasiuk et al., 2022).

As vacinas terapêuticas têm como base a identificação de marcadores proteicos específicos do fenótipo de uma doença o que poderia evitar o desenvolvimento de uma resposta imune já que os marcadores não seriam reconhecidos pelas APCs. Uma das doenças que poderiam ser tratadas por esse mecanismo seria o câncer, vacinas não virais seriam ideais devido à natureza imunossupressora dos cânceres, como também oferecem a vantagem de usar um antígeno específico para o perfil mutacional do câncer (Brisse et al. 2020, Rosa et al., 2021). A resposta imune induzida por essas vacinas gera memória específica para o tumor assim preservando tecidos saudáveis. Atualmente, existem vacinas profiláticas contra o câncer que tem como alvo oncovírus como o papilomavírus humano e o vírus da hepatite B (Panasiuk et al., 2022).

Para a imunoterapia é essencial que haja imunidade celular, porém vacinas baseadas em proteínas induzem uma resposta humoral mais forte do que

a celular. VLPs tem a habilidade de iniciar a ativação do sistema imune e células dendríticas assim como também podem suplantar o estado imunossupressivo do tumor e levar a uma forte resposta imune. No contexto do câncer, é necessário identificar antígenos que sejam diferentes dos antígenos expressos em células saudáveis, entre eles há a forma aberrante glicosilada da MUC1 (mucina 1) que é expressa em diversos cânceres (Panasiuk et al., 2022). Nesse estudo de Panasiuk e colaboradores (2022), foi utilizado *L. tarentolae* para a produção de Norovirus VLPs que apresentam cópias do epítipo da MUC1 na superfície. Foi demonstrado no estudo eficiente estimulação do sistema imune contra patógenos e antígenos associados a tumores, a vacina tem potencial para ser usada tanto de maneira profilática quanto de maneira terapêutica já que induz tanto resposta humoral quanto celular assim como ADCC (citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos) (Panasiuk et al., 2022).

Glicoproteínas são as proteínas recombinantes mais aprovadas para terapêutica, o que inclui anticorpos monoclonais (Lai et al., 2019). Por isso, um sistema de expressão capaz de promover modificações pós-traducionais corretas e glicosilação é tão importante, pois afeta a atividade biológica da proteína e também atua como um mecanismo de controle de qualidade, aumenta a meia-vida e epítipos específicos podem regular a interação com as células (Klatt et al., 2019).

Anticorpos monoclonais têm sido amplamente utilizados no tratamento de câncer e doenças autoimunes, sua aplicação na terapêutica se dá por sua baixa toxicidade, alta especificidade contra os antígenos alvo e habilidade de induzir resposta imune natural. Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgG, IgM, IgE; entre essas a maioria dos anticorpos monoclonais aprovados para uso terapêutico são do tipo IgG. Entre as imunoglobulinas comercializadas, a maioria é produzida por sistemas de expressão como CHO, NS0 e Sp2/0 por produzirem padrões de glicosilação semelhantes aos de humanos. Anticorpos completos ainda não foram expressos por *L. tarentolae*, mas subunidades foram expressas com sucesso. O sistema de expressão utilizando *L. tarentolae* é atrativo para a produção de anticorpos monoclonais para a terapia devido às vantagens mencionadas anteriormente neste trabalho (Lai et al., 2019).

As subunidades expressas no protozoário foram scFv (fragmento de anticorpo de cadeia única), scFv fusionado com a região Fc de IgG de coelhos e rFc (receptores Fc) de cadeia única (Lai et al., 2019).

O fragmento de anticorpo de cadeia única consiste em um único polipeptídeo sendo a menor parte funcional de um anticorpo monoclonal e é composto de regiões variáveis de cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas. No estudo foram expressas quatro scFv humanas recombinantes utilizando o vetor contendo a sequência SP (peptídeo sinal) de SAP1 (ácido fosfatase 1 secretada) de *Leishmania mexicana*. A estratégia de utilizar essa sequência de peptídeo sinal já havia sido aplicada com sucesso para a expressão de eritropoetina humana, proteína C reativa e lamininas no vetor (Klatt e Konthur, 2012).

A fusão entre um scFv com uma região Fc irá resultar em um formato de anticorpo bivalente similar com um anticorpo tradicional, algumas das vantagens desse formato é que a afinidade aumenta já que há múltiplos epítopos disponíveis, a tendência de agregação diminui e devido ao aumento de tamanho a meia-vida sérica também aumenta. Esse estudo demonstrou pela primeira vez a expressão desse tipo de construto em *L. tarentolae* indicando que esse sistema de expressão é uma alternativa viável para casos em que não ocorre uma boa expressão dos anticorpos bivalentes em sistemas procariotos e como uma alternativa eficiente ao sistema de expressão utilizando células de mamíferos (Mathias Lindh Jørgensen et al., 2014).

A *L. tarentolae* já foi utilizada como vacina viva contra tumores associados ao HPV expressando a proteína recombinante E7 (Hosseini et al., 2021). O HPV é uma das principais causas de câncer cervical e os genótipos 16, 18, 31 e 45 são considerados de alto risco estando associados com a maioria dos cânceres cervicais sendo o tipo 16 existente em metade das malignidades induzidas por HPV por isso a importância de desenvolver uma vacina. As proteínas E6 e E7 são oncoproteínas do HPV sendo muito importantes no processo de carcinogênese. Porém, a proteína E7 é expressa de forma mais abundante do que a proteína E6

por isso é o foco da pesquisa para desenvolver uma vacina contra HPV (Salehi et al., 2012). Diversas vacinas contra HPV E6 e E7 foram desenvolvidas utilizando diferentes estratégias, entre elas o uso de vacinas vivas, porém os microrganismos explorados apresentaram algumas desvantagens como patogenicidade, reinfeção e toxicidade (Salehi et al., 2012, Shirbaghaee et al., 2015). Dessa forma, *L. tarentolae* surge como um candidato ideal para ser utilizado como vacina viva já que o protozoário irá ter como alvo as APCs, induz resposta imune Th1, não se replica nas APCs e é eliminado após a infecção (Salehi et al., 2012, Shirbaghaee et al., 2015). No estudo de Salehi e colaboradores (2012), *L. tarentolae* expressou a proteína E7 do HPV16 e demonstrou imunogenicidade e proteção contra tumores *in vivo*. A administração do protozoário foi realizada de forma subcutânea em camundongos BALB/c, foi observado que a vacinação induziu forte resposta humoral (IgG2a) e celular (IFN- γ) (Salehi et al., 2012).

Também já foi demonstrado eficácia como vacina profilática contra HPV expressando o antígeno HPV16 L1 (Mukherjee et al., 2023). No estudo de Shirbaghee e colaboradores (2015), *L. tarentolae* expressando a proteína L1 do HPV16, uma proteína do capsídeo do papilomavírus humano, foi utilizada para a imunização induzindo imunogenicidade e levou a um aumento dos níveis de IgG1 e IgG2a. A vacinação foi realizada de forma subcutânea em camundongos C57BL/6.

No estudo de Bolhassani e colaboradores (2015), a proteína L1 de HPV16 foi expressa em *L. tarentolae* como VLP. A vacina foi aplicada em camundongos C57BL/6 sendo avaliado os níveis de IgG1 e IgG2a contra o antígeno VLP após a imunização, sendo notado um aumento desses anticorpos assim como uma estável resposta imune humoral. O aumento total de IgG indica uma resposta imune humoral duradoura e a avaliação dos níveis de IgG1 e IgG2a sugerindo assim resposta Th1.

5.3.3 Modelo Anti-*Leishmania*

As leishmanioses são um grave problema de saúde pública e o número de casos vem crescendo ao longo das últimas décadas, segundo dados da OMS (Organização Mundial da Saúde). O controle das leishmanioses, principalmente do tipo zoonótico, não teve muito sucesso e o tratamento da doença vem enfrentando problemas devido a resistência às drogas utilizadas e seus efeitos colaterais. Assim, se faz necessário estudos que possam desenvolver melhores métodos de tratamentos e o desenvolvimento de vacinas contra a doença (Klatt et al., 2019, Salari et al., 2020). A Leishmaniose pode ser dividida em quatro formas clínicas: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Shokouhy et al., 2022).

Para poder ser utilizada como vacina anti-*Leishmania*, é necessário estabelecer o tipo de imunomodulação que a *L. tarentolae* determina em mamíferos. A ativação clássica de macrófagos com polarização das células T CD4+ para a resposta Th1 protege contra a infecção da maioria das formas de leishmanioses, enquanto a ativação alternativa de macrófagos e resposta Th2 deixa o hospedeiro mais suscetível a desenvolver infecção a leishmanioses. Portanto, para o desenvolvimento de vacinas contra *Leishmania* é necessário identificar adjuvantes capazes de polarizar a resposta imune para uma ativação clássica de macrófagos e resposta Th1. Há evidência da capacidade de *L. tarentolae* ser incorporada por células dendríticas e da produção de forma moderada de citocinas associadas com a resposta Th1 (Bandi et al., 2023, Varotto-Boccazzi et al., 2022). Também é necessário produzir uma alta quantidade de IFN- γ que são cruciais para a ativação dos macrófagos que vão eliminar os parasitas de *Leishmania* intracelulares (Lajevardi et al., 2022)

Vacinas anti-*Leishmania* inativadas ou atenuadas utilizando células de *Leishmania* completas ainda não estão disponíveis de forma comercial devido a algumas desvantagens relacionadas a imunogenicidade, modulação da resposta imune e problemas para a produção em larga escala assim como a distribuição logística (Bandi et al., 2023). Essas limitações poderiam ser contornadas com a utilização de *L. tarentolae* como patógeno substituto (Bandi et al., 2023) e além

disso evitaria problemas relacionados à segurança já que o protozoário não é patogênico para humanos (Lajevardi et al., 2022).

O genoma de *L. tarentolae* é 90% homólogo em relação aos dos parasitas patogênicos do gênero *Leishmania*, como *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Dos cerca de 250 genes, a maioria deles estão envolvidos com a sobrevivência do protozoário dentro das células. Essa proximidade do genoma permite que *L. tarentolae* seja utilizada para a expressão de proteínas de tripanosomatídeos assim como a produção de cepas transgênicas de *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*, o que permite a caracterização funcional das proteínas desconhecidas dessas espécies, investigação de interação do parasita com seu hospedeiro, triagem de drogas anti-*Leishmania* como também o desenvolvimento de vacinas (De Oliveira et al., 2019). Por exemplo, alguns fatores de virulência presentes em espécies patogênicas de *Leishmania* também estão presentes em *L. tarentolae*. Ademais, *L. tarentolae* compartilha as mesmas proteínas, vias metabólicas e funções bioenergéticas das *Leishmanias* patogênicas (Geroldinger et al., 2019).

As formas promastigotas e amastigotas de *L. tarentolae* já foram utilizadas para triagem de drogas anti-*leishmania* e são amplamente utilizadas como modelos de estudo *in vitro*. Uma boa correlação dos valores IC50 foi observado entre *L. tarentolae* e espécies patogênicas de *Leishmania* e estudos utilizando as formas promastigotas e amastigotas demonstraram que os valores IC50 para drogas anti-*Leishmania*, como anfotericina B, dependem mais da fase de desenvolvimento do parasita do que do estágio do ciclo biológico no qual o parasita se encontra (Geroldinger et al., 2019).

No estudo de Geroldinger e colaboradores (2019), foram utilizadas formas promastigotas de *L. tarentolae* para monitorar a detecção de radicais superóxidos em macrófagos durante a infecção por *Leishmania* possibilitando assim estudar e entender de uma melhor forma a maturação de espécies patogênicas dentro dos macrófagos.

Em outro estudo, foi avaliada a resistência a determinadas drogas pelos parasitas do gênero *Leishmania* onde os testes foram realizados em uma cepa de *L. tarentolae*. Foi selecionado um clone resistente a acivicin, uma droga anticâncer que é ativa contra formas promastigotas e intracelulares de *L. donovani*. Dessa forma, foi possível estudar as vias bioquímicas dessa droga e encontrar possíveis alvos para o desenvolvimento de outras drogas. Também, possibilitou caracterizar a resistência fenotipicamente, sendo notado uma diminuição da acumulação de glutamato nessa cepa. O acivicin aparentemente é conduzido por um transportador de glutamato um mecanismo pouco conhecido em *Leishmania* e parasitas cinetoplastídeos. Assim, utilizando *L. tarentolae* esse estudo elaborou sobre a complexidade de mutações relacionadas à resistência a drogas e propôs uma descoberta sobre transportador de glutamato em *Leishmania* (Roy et al., 2021).

Para aumentar a imunogenicidade de *L. tarentolae* como vacina contra leishmaniose em cães e em humanos é possível modificar geneticamente o protozoário para que ele expresse antígenos das espécies patogênicas de *Leishmania* ou expressar proteínas imunomoduladoras associadas com ativação da resposta clássica de macrófagos (Bandi et al., 2023, Varotto-Boccazzi et al., 2022). Assim, fica evidenciado o potencial uso de *L. tarentolae* como candidato de vacina anti-*Leishmania* tanto na sua forma natural quanto geneticamente modificada para obtenção de melhores resultados, sendo assim seria benéfico maiores estudos sobre o tema (Bandi et al., 2023).

6 CONCLUSÃO

Por meio desse trabalho, é evidente que *L. tarentolae* é um microrganismo promissor com potencial para se tornar uma das principais escolhas para a produção de proteínas recombinantes em larga escala especialmente levando em consideração o baixo custo de cultivo, rendimento e padrão de glicosilação homogêneo e semelhante ao de humanos. Dessa forma, representando uma alternativa atraente aos sistemas de expressão clássicos. Nota-se que mais estudos são necessários para elucidar algumas questões sobre o protozoário e tornar possível o seu aprimoramento como sistema de expressão, até mesmo possibilitando explorar seu potencial além das opções apresentadas até o momento. Uma desvantagem que pode ser observada é o baixo nível de expressão se comparado com células de mamíferos, porém há perspectivas promissoras para superar esse problema. Além disso, *L. tarentolae* produz padrões de O-glicosilação defeituosos o que requer pesquisas nessa área para que seja possível humanizar o perfil de glicosilação do protozoário.

Ademais, o protozoário tem como alvo células apresentadoras de antígenos e órgãos linfóides, uma característica vantajosa no desenvolvimento de plataformas vacinais e que pode ser bem explorada em estudos clínicos futuros. Uma área de aplicação promissora para utilização de *L. tarentolae* é a produção de anticorpos monoclonais que são usados na imunoterapia contra câncer e doenças autoimunes assim representando uma alternativa promissora no tratamento dessas doenças.

Conclui-se neste trabalho que é perceptível a capacidade da *L. tarentolae* de atuar como plataforma de entrega de antígenos, vacina viva e modelo de estudo de espécies patogênicas do gênero *Leishmania*, sendo assim mais estudos precisam ser desenvolvidos para que haja um melhor entendimento sobre a espécie para ampliar as suas áreas de aplicação e aproveitar suas características biológicas para o desenvolvimento de novos tratamentos permitindo sua expansão como sistema modelo na biotecnologia voltada para a saúde.

REFERÊNCIAS

- ABARGHOOI KAHAKI, F. et al. Expression and Purification of Membrane Proteins in Different Hosts. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 4, p. 2077–2087, 2020.
- ANSARI, N. et al. A non-pathogenic *Leishmania tarentolae* vector based- HCV polytope DNA vaccine elicits potent and long lasting Th1 and CTL responses in BALB/c mice model. **Molecular Immunology**, v. 111, p. 152–161, 2019.
- ATTARPOUR YAZDI, M. M. et al. Enhancement of Expression Level of Modified t-PA (TNKase) in *Leishmania tarentolae* by Induction System. **Iranian Biomedical Journal**, v. 23, n. 4, p. 272–279, 2019.
- BAGHBAN, R. et al. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 365–384, 2019.
- BANDI, C. et al. *Leishmania tarentolae*: a vaccine platform to target dendritic cells and a surrogate pathogen for next generation vaccine research in leishmaniases and viral infections. v. 16, n. 1, 2023.
- BAVARSAH AHMADPOUR, N.; DALIMI, A.; PIRESTANI, M. Evaluation of a Novel Multi-Epitope Peptide Vaccine Candidate from LACK, LeIF, GP63, SMT Antigens of *Leishmania major* in BALB/c Mice. **Archives of Razi Institute**, v. 77, n. 6, p. 2223–2233, 2022.
- BOLHASSANI, A. et al. VLP production in *Leishmania tarentolae* : A novel expression system for purification and assembly of HPV16 L1. **Protein Expression and Purification**, v. 116, p. 7–11, 2015.
- BOUZEYEN, R.; JAVID, B. Therapeutic Vaccines for Tuberculosis: An Overview. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.
- BRISSE, M. et al. Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

DE OLIVEIRA, T. A. et al. Application of the LEXSY Leishmania tarentolae system as a recombinant protein expression platform: A review. **Process Biochemistry**, v. 87, p. 164–173, 2019.

EPIS, S. et al. Efficacy of mucosal vaccination using a protozoan parasite as a vehicle for antigen delivery: IgG and neutralizing response after rectal administration of LeCoVax-2, a candidate vaccine against COVID-19. **Pharmacological Research**, v. 186, p. 106546, 2022.

FERRER, M. et al. Production of Recombinant Trypanosoma cruzi Antigens in Leishmania tarentolae. **Methods in molecular biology**, 2019.

GARBUGLIA, A. R. et al. The Use of Both Therapeutic and Prophylactic Vaccines in the Therapy of Papillomavirus Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

GEROLDINGER, G. et al. Techniques to study phagocytosis and uptake of Leishmania tarentolae by J774 macrophages. v. 197, p. 57–64, 2019.

GÜNDÜZ ERGÜN, B. et al. Established and Upcoming Yeast Expression Systems. **Methods in Molecular Biology**, p. 1–74, 2019.

HOSSEIN, M. et al. Review of Development of Live Vaccines against Leishmaniasis. **Journal of child science**, v. 11, n. 01, p. e178–e184, 2021.

ILARIA VAROTTO-BOCCAZZI et al. Leishmania tarentolae as an Antigen Delivery Platform: Dendritic Cell Maturation after Infection with a Clone Engineered to Express the SARS-CoV-2 Spike Protein. **Vaccines**, v. 10, n. 5, p. 803–803, 2022.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. Pichia pastoris: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867–5881, 2020.

KAYSER, V.; RAMZAN, I. Vaccines and vaccination: History and emerging issues. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 12, p. 1–14, 2021.

KLATT, S.; KONTHUR, Z. Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in Leishmania tarentolae. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 97, 2012.

KLATT, S. et al. *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007424, 2019.

LAI, J. Y.; KLATT, S.; LIM, T. S. Potential application of *Leishmania tarentolae* as an alternative platform for antibody expression. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 380–394, 2019.

LAJEVARDI, M. S. et al. Structural analysis of PpSP15 and PsSP9 sand fly salivary proteins designed with a self-cleavable linker as a live vaccine candidate against cutaneous leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, 2022.

LI, T. et al. Current progress in the development of prophylactic and therapeutic vaccines. **Science China-life Sciences**, v. 66, n. 4, p. 679–710, 2022.

MAJIDIANI, H. et al. Multi-epitope vaccine expressed in *Leishmania tarentolae* confers protective immunity to *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p. 104925, 2021.

MARUGGI, G. et al. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 4, p. 757–772, 2019.

MATHIAS LINDH JØRGENSEN et al. Expression of single-chain variable fragments fused with the Fc-region of rabbit IgG in *Leishmania tarentolae*. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.

MEHRDAD SHOKOUHY et al. Isolation, characterization, and functional study of extracellular vesicles derived from *Leishmania tarentolae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.

MENDOZA-ROLDAN, J. A. et al. Detection of *Leishmania tarentolae* in lizards, sand flies and dogs in southern Italy, where *Leishmania infantum* is endemic: hindrances and opportunities. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, 2021.

MENDOZA-ROLDAN, J. A. et al. *Leishmania tarentolae* : A new frontier in the epidemiology and control of the leishmaniases. v. 69, n. 5, 2022.

MORAES, L. et al. Production of a kinesin-related recombinant protein (Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. **One Health**, v. 8, p. 100111–100111, 2019.

MORÃO, L. G. et al. A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. **PloS One**, v. 17, n. 7, p. e0271403, 2022.

MUKHERJEE, A. G. et al. Exploring the Molecular Pathogenesis, Pathogen Association, and Therapeutic Strategies against HPV Infection. **Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 25, 2023.

NAKAMARU, R. et al. Future Directions of Therapeutic Vaccines for Chronic Diseases. **Circulation Journal**, v. 84, n. 11, p. 1895–1902, 2020.

OWCZAREK, B.; GERSZBERG, A.; HNATUSZKO-KONKA, K. A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–13, 2019.

PANASIUK, M. et al. Immunization with *Leishmania tarentolae*-derived norovirus virus-like particles elicits high humoral response and stimulates the production of neutralizing antibodies. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, 2021.

PANASIUK, M. et al. Chimeric virus-like particles presenting tumour-associated MUC1 epitope result in high titers of specific IgG antibodies in the presence of squalene oil-in-water adjuvant: towards safe cancer immunotherapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, 2022.

PUETZ, J.; WURM, F. M. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. **Processes**, v. 7, n. 8, p. 476, 2019.

ROSA, S. S. et al. mRNA Vaccines manufacturing: Challenges and Bottlenecks. **Vaccine**, v. 39, n. 2021.

ROY, G. et al. Decreased glutamate transport in acivicin resistant *Leishmania tarentolae*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, p. e0010046, 2021.

SALARI, S. et al. Evaluation of a new live recombinant vaccine against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, 2020.

SALEHI, M. et al. Recombinant *Leishmania tarentolae* encoding the HPV type 16 E7 gene in tumor mice model. **Immunotherapy**, v. 4, n. 11, p. 1107–1120, 2012.

SHIRBAGHAEI, Z. et al. A Live Vector Expressing HPV16 L1 Generates an Adjuvant-Induced Antibody Response In-vivo. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 8, n. 6, p. e3991, 2015.

SOBHANI, N. et al. Therapeutic cancer vaccines: From biological mechanisms and engineering to ongoing clinical trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 109, p. 102429, 2022.

STUTZ, H. Advances and applications of capillary electromigration methods in the analysis of therapeutic and diagnostic recombinant proteins – A Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 222, p. 115089, 2023.

TICHÁ, L. et al. Development of Various *Leishmania* (*Sauroleishmania*) *tarentolae* Strains in Three *Phlebotomus* Species. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2256–2256, 2021.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. 420, 2019.

TÜRKANOĞLU ÖZÇELİK, A.; YILMAZ, S.; INAN, M. *Pichia pastoris* Promoters. **Methods in Molecular Biology**, p. 97–112, 2019.

VAROTTO-BOCCAZZI, I. et al. Epidemic Preparedness—*Leishmania tarentolae* as an Easy-to-Handle Tool to Produce Antigens for Viral Diagnosis: Application to COVID-19. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

VÍTOR ENNES-VIDAL et al. Differences in Charge Distribution in *Leishmania tarentolae* Leishmanolysin Result in a Reduced Enzymatic Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7660–7660, 2022.

WANG, S. et al. Viral vectored vaccines: design, development, preventive and therapeutic applications in human diseases. v. 8, n. 1, 2023.

ZIMNA, M. et al. Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on Leishmania-derived virus-like particles. **Antiviral Research**, v. 209, p. 105511–105511, 2023.