



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Rafaela Branco Fernandes

Relatórios de Estágio orientados pela Dra. Maria Ivone Fernandes Rebelo e pela Dra. Clementina Maria Atanásio Varelas e Monografia Intitulada “Whole-sporozoite vaccines against malaria: Current approaches and future prospects based on genetically modified *Plasmodium berghei* sporozoites” orientada pela Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro referente à Unidade Curricular “ Estágio” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Fevereiro de 2023



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Rafaela Branco Fernandes

Relatórios de Estágio orientados pela Dra. Maria Ivone Fernandes Rebelo e pela Dra. Clementina Maria Atanásio Varelas e Monografia Intitulada “Whole-sporozoite vaccines against malaria: Current approaches and future prospects based on genetically modified *Plasmodium berghei* sporozoites” orientada pela Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro referente à Unidade Curricular “ Estágio” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Fevereiro de 2023

## Declaração

Eu, Rafaela Branco Fernandes, estudante do Mestrado Integrada em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2017245647, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Whole-sporozoite vaccines against malaria: Current approaches and future prospects based on genetically modified *Plasmodium berghei* sporozoites” apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, Segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à excepção das opiniões pessoais.

Coimbra, 1 de fevereiro de 2023.

Rafaela Branco Fernandes

(Rafaela Branco Fernandes)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais e irmão, por terem sido a base da concretização deste sonho e por sempre me terem apoiado incondicionalmente.

Aos amigos de sempre, e àqueles que Coimbra me deu a conhecer e tornaram o meu percurso mais bonito.

À Professora Doutora Olga Ribeiro, pelas orientações, paciência e acompanhamento ao longo desta Monografia.

À Dra. Ivone Rebelo e restante equipa da farmácia Monte Formoso, que me integraram desde o primeiro dia e estiveram sempre à disposição. A vocês, estarei eternamente grata!

À Dra. Clementina Varelas e restante equipa dos serviços farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, que enriqueceram o culminar do meu percurso académico.

A Coimbra, eterna saudade e lição, que fez de mim aquilo que sou hoje. Em ti, fui feliz!

A todos, muito obrigada por terem feito parte deste caminho.

**Rafaela**

# Índice

## **Parte I - Relatório de estágio em Farmácia Comunitária - Farmácia Monte Formoso**

Abreviaturas .....	7
1. Nota Introdutória .....	8
2. Análise SWOT .....	9
2.1 Pontos Fortes ( <i>Strengths</i> ) .....	9
2.1.1 Equipa multidisciplinar e filosofia <i>Kaizen</i> .....	9
2.1.2 Diversidade de serviços .....	10
2.1.3 Utentes fidelizados .....	10
2.2 Pontos Fracos ( <i>Weaknesses</i> ).....	11
2.2.1 Nomes comerciais.....	11
2.2.2 Aconselhamento em produtos veterinários .....	11
2.2.3 Pouco aconselhamento em dermocosmética .....	11
2.3. Oportunidades ( <i>Opportunities</i> ).....	11
2.3.1 Estagiário único.....	11
2.3.2 Período Sazonal .....	12
2.3.3 Serviço de cessação tabágica.....	12
2.4. Ameaças ( <i>Threats</i> ).....	12
2.4.1 Barreira inicial entre estagiário-utente.....	12
2.4.2 Comparação do PVP de produtos de venda livre em farmácia comunitária com outros estabelecimentos.....	13
3. Casos Práticos .....	13
4. Considerações Finais.....	16
5. Referências Bibliográficas.....	17

## **Parte II - Relatório de estágio em Farmácia Hospitalar - Serviços Farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil**

Abreviaturas .....	19
1. Nota Introdutória .....	20
2. Análise SWOT.....	21
2.1 Pontos Fortes ( <i>Strengths</i> ) .....	21
2.1.1 Interligação entre diferentes profissionais de saúde .....	21
2.1.2 Integração nos diferentes setores dos serviços farmacêuticos .....	22
2.2. Pontos Fracos ( <i>Weaknesses</i> ).....	22
2.2.1 Realização de poucas atividades de índole farmacêutica .....	22
2.2.2 Uso de sacos de plástico na cedência de medicação ao doente.....	23
2.3. Oportunidades ( <i>Opportunities</i> ).....	23
2.3.1 Consolidação de conhecimentos dos diferentes grupos terapêuticos e a sua relação com a oncologia .....	23
2.3.2 Ação formativa sobre nutrição parentérica .....	23
2.4. Ameaças ( <i>Threats</i> ).....	24
2.4.1 Escassez de recursos para uma optimização da monitorização da terapêutica do doente. 24	

3. Caso Prático de Intervenção Farmacêutica.....	24
4. Considerações finais .....	25
5. Referências Bibliográficas.....	26

**Parte III - Monografia: "Whole-sporozoite vaccines against malaria: Current approaches and future prospects based on genetically modified *Plasmodium berghei* sporozoites"**

Abbreviations .....	28
1. Introduction .....	32
2. Malaria .....	33
2.1. Epidemiology and etiology.....	33
2.2. <i>Plasmodium</i> life cycle .....	33
2.3. Prevention tools and strategies.....	34
3. Malaria Vaccines and actual challenges.....	35
3.1. Vaccine Targets .....	36
4. Pre- erythrocytic vaccines.....	38
4.1. Subunit vaccines.....	38
4.2. Whole - sporozoite vaccines: current approaches .....	40
5. A new approach of attenuation: genetically modified <i>Plasmodium berghei</i> sporozoites .....	42
5.1. <i>PbVac</i> : Safety, Efficacy, and Immunological assessment.....	44
6. Future perspectives of <i>P.berghei</i> -based on whole-sporozoite vaccination.....	47
7. Final Remarks .....	48
8. References.....	49

# Parte I

## Relatório de Estágio de Farmácia Comunitária

### Farmácia Monte Formoso

Sob orientação da Dra. Maria Ivone Fernandes Barroso Borges Rebelo



## **Abreviaturas**

<b>ADO</b>	Antidiabético oral
<b>DCI</b>	Denominação Comum Internacional
<b>EC</b>	Estágio Curricular
<b>FMF</b>	Farmácia Monte Formoso
<b>ISRS</b>	Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina
<b>MICF</b>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>MNSRM</b>	Medicamento não sujeito a receita médica
<b>MSRM</b>	Medicamento sujeito a receita médica
<b>NOAC</b>	Do inglês, <i>Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants</i>
<b>PVP</b>	Preço de venda ao público
<b>SNS</b>	Serviço Nacional de Saúde
<b>SWOT</b>	Do inglês, <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>



## I. Nota Introdutória

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) permite consolidar e pôr em prática os conhecimentos adquiridos ao longo de 5 anos através do Estágio Curricular (EC) realizado no último semestre em diferentes áreas profissionais, sendo uma delas Farmácia Comunitária. Embora as Ciências Farmacêuticas tenham uma vasta área de saídas profissionais, é na Farmácia Comunitária que se concentram grande parte dos farmacêuticos, e é também através dela que podemos exercer a nossa função mais direta na sociedade. O farmacêutico, além de ser o especialista do medicamento, e de se encontrar em todas as áreas onde está presente o medicamento, é também o primeiro profissional de saúde ao qual a sociedade recorre, na maior parte das vezes, seja pela facilidade de contacto, pela criação de uma relação mais estreita ou pela confiança e qualidade no aconselhamento e prestação de cuidados primários de saúde<sup>1</sup>. É por isso, fundamental aprimorar os conhecimentos adquiridos de modo a concluir o 2º ciclo de estudos do MICF.

Neste contexto, realizei o meu EC em Farmácia Comunitária na Farmácia Monte Formoso (FMF), na rua Cidade de Halle, localizada na cidade de Coimbra, tendo sido orientada pela Dra. Maria Ivone Rebelo, Farmacêutica Substituta. A FMF é composta por 4 elementos, todos eles farmacêuticos, sendo a responsabilidade técnica do Dr. Gilberto Gaio. Trata-se de uma equipa multidisciplinar e jovem que procura estar próximos das necessidades dos utentes, facto acentuado por esta farmácia se localizar numa zona residencial da cidade, resultando numa maior proximidade entre utente-farmacêutico. O meu período de estágio foi compreendido entre 10 de janeiro a 13 de maio de 2022.

O presente relatório assenta numa análise *SWOT* (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), que veio estimular a minha postura crítica ao longo do estágio, resultando numa maior capacidade de identificação de problemas e desafios bem como a procura de soluções.

## 2. Análise SWOT

Como estabelecido pelas normas orientadoras de estágio, na tabela I estão identificadas e posteriormente descritas, algumas das características relativas à farmácia e ao plano de estudos de MICF que contribuíram beneficentemente (Pontos Fortes) ou dificultaram (Pontos Fracos) o meu desempenho ao longo do estágio. São também apresentadas situações externas que vieram fomentar (Oportunidades) ou, por outro lado, limitar o meu desenvolvimento e aprendizagem (Ameaças).

**Tabela I:** Análise SWOT. Identificação dos pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças identificadas no decurso do estágio.

<b>Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)</b>	<b>Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Equipa multidisciplinar e filosofia <i>Kaizen</i>;</li><li>➤ Diversidade de serviços;</li><li>➤ Utentes fidelizados.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Nomes Comerciais;</li><li>➤ Aconselhamento em produtos veterinários;</li><li>➤ Pouco aconselhamento de dermocosmética.</li></ul>
<b>Oportunidades (<i>Opportunities</i>)</b>	<b>Ameaças (<i>Threats</i>)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Estagiário único;</li><li>➤ Período sazonal;</li><li>➤ Serviço de cessação tabágica.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Barreira inicial entre estagiário-utente;</li><li>➤ Comparação do preço de venda ao público (PVP) de produtos de venda livre em farmácia comunitária com outros estabelecimentos.</li></ul>

### 2.1 Pontos Fortes (*Strengths*)

#### 2.1.1 Equipa multidisciplinar e filosofia *Kaizen*

A equipa da FMF para além da sua atividade farmacêutica, está frequentemente envolvida em formações contínuas. Assim, foi fundamental para o meu estágio contactar com uma equipa proativa, o que acabou por me incentivar a participar também em formações externas por delegados de informação médica. Além disso, a farmácia tinha implementada a Filosofia *Kaizen*, que tem sido muito desenvolvida ao longo do tempo e difundida por todo o mundo, cujo objetivo consta na melhoria contínua e na gestão sistemática que envolve toda a equipa. Eram frequentes reuniões com todos os membros, bem como a existência de uma área de comunicação onde eram expostas questões e problemas a serem discutidos, e outra área onde eram apresentadas todas as funções e atividades semanais e mensais de cada membro da

equipa, bem como respetivos horários de trabalho. A meu ver, esta é uma excelente ferramenta de trabalho, que quando bem aplicada pode maximizar recursos e otimizar resultados.

### 2.1.2 Diversidade de serviços

A vertente de atuação mais significativa, e aquela em que o farmacêutico comunitário está mais representado, é no aconselhamento farmacêutico junto da comunidade. Em acréscimo, a farmácia Monte Formoso dispunha de outros serviços como: preparação de medicamentos manipulados, preparação de medicação individualizada, realização do teste da glicémia, perfil lipídico, medição da pressão arterial e da frequência cardíaca, administração de injetáveis e ainda o serviço de cessação tabágica. Esta diversidade de serviços foi fundamental, não só porque pude participar e observar (no caso da administração de injetáveis) em todos eles, como também mudar a visão limitada que tinha anteriormente acerca da intervenção do farmacêutico comunitário. Junto da comunidade estes serviços revelam-se uma mais-valia pois é à farmácia, normalmente, que as pessoas recorrem primeiramente. A execução destes serviços tem por base a monitorização de fatores de risco associados ao desenvolvimento de patologias com elevada mortalidade e morbidade, sendo por isso necessária sensibilização e apoio junto da comunidade.

### 2.1.3 Utentes fidelizados

A FMF possui um elevado número de utentes habituais, nomeadamente residentes da zona que vão frequentemente buscar a sua medicação, e solicitar aconselhamento quando necessário. Consequentemente, a farmácia tinha acesso ao seu histórico de medicação habitual e ainda a outros dados, tais como: alergias, efeitos adversos a determinados medicamentos e outras advertências importantes. Estas informações são extremamente importantes no seguimento do utente e prestação de apoio já que, atualmente, as farmácias comunitárias ainda não estão inseridas em redes de partilhas de dados clínicos do doente. Isto pode comprometer seriamente o acompanhamento individualizado, pois deixamos de ter acesso a dados cruciais, caso o utente adquira noutra farmácia ou até hospital. Até lá, torna-se ainda mais importante a fidelização desses utentes, principalmente na aquisição da sua medicação e monitorização de parâmetros.

## **2.2 Pontos Fracos (*Weaknesses*)**

### 2.2.1 Nomes comerciais

Desde o início do estágio verifiquei que a maioria dos utentes tinham propensão em denominar os medicamentos pelo seu nome comercial. Inicialmente, a compreensão ao medicamento pretendido era um obstáculo, pois ao longo do MIFC tornamo-nos mais familiarizados com a respetiva denominação comum internacional (DCI). No entanto, ao longo desses meses essa dificuldade foi diminuindo, quer pela prática ao balcão, quer por atividades de *backoffice* como a receção e conferência de encomendas, pois permitiu-me um contacto mais estreito com os nomes comerciais.

### 2.2.2 Aconselhamento em produtos veterinários

A FMF é uma farmácia muito procurada na aquisição de produtos veterinários, principalmente em casos de desparasitações interna e externas de animais de companhia, como cães e gatos. No entanto, senti algumas dificuldades no aconselhamento destes, pedindo muitas vezes auxílio a um dos membros da equipa. Apesar das bases adquiridas no MIFC, senti necessidade de um estudo posterior mais aprofundado, para conseguir exercer os próximos aconselhamentos veterinários.

### 2.2.3 Pouco aconselhamento em dermocosmética

Durante o estágio curricular foram poucas as vezes que fui abordada para o aconselhamento em dermocosmética. A grande parte das vezes, as pessoas já se dirigiam à farmácia com determinado produto em mente e não estavam abertas a aconselhamento mesmo quando questionadas. Por outro lado, a farmácia encontrava-se numa zona mais carenciada e sem poder de compra, e por isso eram raras as pessoas que se dirigiam à farmácia para esse mesmo aconselhamento.

## **2.3. Oportunidades (*Opportunities*)**

### 2.3.1 Estagiário único

Ao longo do estágio (exceto maio) fui a única estagiária de MIFC na farmácia Monte Formoso, daí ter tido a oportunidade de acompanhar de perto e de realizar um maior número de tarefas diferenciadas, sentindo-me por isso mais desafiada. Além disso, permitiu-me um contacto mais chegado com todos os membros da equipa, que acabavam por ter também mais disponibilidade para me acompanharem, tirando assim mais proveito.

### 2.3.2 Período Sazonal

Tendo em conta o período de realização deste estágio (janeiro-maio), contactei com diversas patologias características destas épocas sazonais, das quais destaco: gripes e constipações, no inverno, e alergias, na primavera. Deste modo, aprofundei mais os meus conhecimentos a nível prático destas patologias sazonais, tornando-me mais capaz no futuro de exercer o aconselhamento farmacêutico.

### 2.3.3 Serviço de cessação tabágica

Nas últimas semanas de estágio tive a oportunidade de ajudar a introduzir o serviço de cessação tabágica. A criação deste serviço tem como foco a pessoa fumadora, as suas preocupações e consequências do ato de fumar. Para isto foi necessário um estudo robusto e formação por parte de toda a equipa, no que diz respeito ao funcionamento do serviço, e respetiva introdução no contexto de farmácia comunitária. O serviço foi promovido, essencialmente ao balcão, o que veio incitar a minha comunicação com os utentes. Já na consulta realizada, exclusivamente no gabinete de apoio ao utente, era feita uma entrevista onde avaliávamos o nível de motivação da pessoa, os seus objetivos e receios. Posteriormente, era desenvolvido o plano terapêutico, caso a pessoa aderisse ao serviço. A partir daí o utente era acompanhado, no espaço de 1 ano, pelo mesmo farmacêutico. É de realçar, nos primeiros tempos, as ações de manutenção do plano mais frequentes como as próprias consultas, mensagens ou chamadas para a pessoa em tratamento.

É indiscutível a criação de uma relação muito mais estreita entre utente- farmacêutico em gabinete em comparação com aquela habitualmente criada ao balcão. É notável que própria pessoa está muito mais calma, pronta a ouvir e a sentir-se escutada, mais motivada e sem interrupções causadas por fatores externos que ao balcão estão, na maior parte das vezes, fora de controlo. Por tudo isto, é irrefutável a importância do serviço de cessação tabágica para o aumento da taxa de sucesso.

## **2.4. Ameaças (*Threats*)**

### 2.4.1 Barreira inicial entre estagiário-utente

Nos primeiros meses de atendimento ao balcão, o receio e a falta de confiança no ato de aconselhamento, traduziram-se num número mais limitado de atendimentos, facto este acentuado pela apreensão de alguns utentes ao serem atendidos pelo elemento estagiário. Contudo, após algum tempo, concluo que essa barreira entre estagiário-utente foi

ultrapassada, sobretudo através da comunicação, crescente conhecimento e uma atitude mais confiante na indicação farmacêutica.

#### 2.4.2 Comparação do PVP de produtos de venda livre em farmácia comunitária com outros estabelecimentos

Eram várias as vezes que as pessoas recorriam à farmácia com a intenção de saber o PVP de determinados produtos de venda livre e, posteriormente, adquiri-los noutros estabelecimentos com PVP, algumas vezes, mais barato, mas que são desprovidos, frequentemente, de profissionais capacitados para o aconselhamento e eventuais interações com outros medicamentos, o que se pode traduzir em graves consequências na saúde do utente.

### **3. Casos Práticos**

Ao longo do estágio, foram frequentes os casos que necessitaram de um atendimento mais personalizado. De seguida, são apresentados e descritos cinco casos práticos que decorreram em contexto de atendimento ao balcão, evidenciando o papel e a importância do farmacêutico na saúde e bem-estar da comunidade.

#### **Caso Prático I**

Utente habitual dirigiu-se à farmácia com uma prescrição de apixabano 5mg (Eliquis<sup>®</sup>) para dar continuidade ao tratamento, e de sertralina 50mg iniciada há cerca de um mês. No decorrer da dispensa, o senhor referiu que andava com pequenas hemorragias nas gengivas. Acabou por referir também falta de libido e distúrbios gastrointestinais. Recolhidos estes dados, pude associar as hemorragias aos efeitos adversos do apixabano, um anticoagulante oral não antagonista da vitamina K (NOAC), e a uma possível interação do apixabano com a sertralina, um inibidor seletivo de recaptção de serotonina (ISRS), que pode potenciar o aumento do risco de hemorragia. Sugeri que devia procurar consultar o médico, pois a dose de apixabano podia ter de ser ajustada, e para avaliar a toma concomitante com a sertralina. Em todo o caso, devia fazer análises, para avaliar parâmetros, nomeadamente, o tempo de protrombina em segundos e o fator anti-FXa no soro.

Já a falta de libido e os distúrbios GI seriam consequências da toma inicial de sertralina, uma vez que estava no início do tratamento, logo a tendência seria para esses sintomas diminuírem

e acabarem por desaparecer. No entanto, recomendei procurar aconselhamento ou contactar o médico se esses sintomas persistissem.

## **Caso Prático II**

Uma senhora com aproximadamente 70 anos solicitou para medir a tensão arterial. Em conversa com a senhora verifiquei que não tomava qualquer medicação para a hipertensão, contudo na última semana tinha andado um pouco ansiosa com uma situação pontual, e além disso, nessa manhã estava com dor de cabeça e sensação de falta de ar. Após a medição, os resultados foram 14,5 mmHg (sistólica) e 7,5 mmHg (diastólica) e frequência cardíaca 84 bpm. Como a senhora atribuía esse período particular à ansiedade decidi dispensar Valdispert® 125 mg (2 a 3 vezes ao dia neste período de ansiedade mais acentuada), um medicamento à base de Extrato de Valeriana, usado para sintomas de ansiedade ligeira. Acrescentei ainda que era importante continuar a monitorizar a tensão arterial até normalizar e, em caso contrário, contactar o médico.

Passado uns dias, a senhora voltou à farmácia medir, novamente, a tensão arterial que já se encontrava a 12,2 mmHg (sistólica) e 6,9 mmHg (diastólica) e com frequência cardíaca a 68 bpm. Concluiu-se que era, de facto, uma situação de ansiedade ligeira e agradeceu o acompanhamento farmacêutico.

## **Caso Prático III**

Um utente com 35 anos chegou à farmácia a queixar-se de cansaço anormal, visão turva. Referiu também aumento da frequência de micção e sede. Como apresentava um quadro sugestivo de diabetes, decidi fazer medição da glicémia, para despiste. Como resultado, apareceu HI no visor. Fiz uma 2ª medição que culminou no mesmo resultado. Consultando o significado verifiquei que a glicémia se encontrava acima de 600 mg/dl. Podendo ocorrer riscos agravados no momento, chamei o 112. Mais tarde, soube-se que tinha sido diagnosticado *Diabetes Mellitus* tipo 2 e tinha sido instituída insulino-terapia até melhoria do estado metabólico, combinada com metformina, um antidiabético oral (ADO) de primeira linha. Posto este caso, é de realçar o papel fulcral do farmacêutico na monitorização de parâmetros que, caso contrário, poderia levar a graves consequências e lesões irreversíveis.

## **Caso Prático IV**

Senhora idosa apresentou queixa de pernas cansadas e inchadas. Solicitando-lhe para observar as pernas, verifiquei a presença de pequenas manchas vermelhas e roxas e além disso tinha a pele seca, não estando a usar qualquer tipo de hidratante. Depois de questionar a utente, constatei que os sintomas se agravavam ao longo do dia. Neste contexto, aconselhei Cedraflon<sup>®</sup>, um creme à base de extrato de cidra de Córsega (*Citrus medica vulgaris*) e mentol, para aplicar diariamente, pois tem uma ação refrescante e hidratante, e além disso ajuda a aliviar a sensação de pernas cansadas. Como terapêutica principal para a sintomatologia apresentada dispensei Daflon<sup>®</sup> 1000, um venotrópico à base de flavonoides micronizados (diosmina e hesperidina), 1 comprimido de manhã. Como medidas não farmacológicas aconselhei evitar os banhos com água muito quente e vestuário apertado. Recomendei também uma boa hidratação, a prática de exercícios favoráveis à boa circulação e massagem de baixo para cima (no sentido ascendente da perna).

## **Caso Prático V**

Jovem de 19 anos com apresentação característica de dermatite atópica nas mãos (eritema, prurido e alguma descamação entre os dedos) solicitou Pandermil<sup>®</sup> (hidrocortisona tópica), um corticosteroide indicado para diversas afeções da pele como a dermatite. Referiu que já o tinha usado nos últimos tempos e que a fase de crise tinha sido resolvida rapidamente, devido ao efeito do corticosteroide. No entanto, tendo em conta os efeitos indesejáveis característicos dos corticosteroides, principalmente pelo seu efeito *rebound* e sensibilizante, aconselhei Dexyane Med<sup>®</sup>, um dispositivo médico à base de hydroxidecina e enoxolona, sem corticosteroides. Recomendei coloca-lo diretamente no eczema, permitindo assim reduzir a inflamação, o prurido e suavizar a *secura cutânea*. Deste modo, limitaria o uso de corticosteroides às fases de crise mais agudas, no máximo durante 5 a 7 dias. Nas fases de remissão deveria usar um creme de prevenção com emolientes e humectantes, como por exemplo o Bephtan SensiControl<sup>®</sup>, de maneira a espaçar as fases de crise e a prolongar as fases de remissão. Alertei que devia ainda ter presente as situações e os agentes de agravamento de forma a evitá-los, como por exemplo joias e produtos irritantes (certos produtos de limpeza ou cosméticos).



#### **4. Considerações Finais**

Findo este estágio, estou certa de que consegui aperfeiçoar e pôr em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF. Além disso, o EC em Farmácia Comunitária deu-me a possibilidade de ter um contacto mais direto e prático com o medicamento e o utente, e assim aplicar os conhecimentos teóricos. Decerto que o estágio superou as minhas expectativas iniciais, pois embora ainda haja um longo caminho a percorrer a importância dos serviços farmacêuticos em contexto de farmácia comunitária são inquestionáveis, não só na qualidade de vida para a sociedade, como para a sustentabilidade do SNS, permitindo reduzir custos e otimizar resultados terapêuticos<sup>2</sup>. É por isso essencial que o farmacêutico possa estar mais envolvido na relação com o SNS, como na partilha de dados clínicos e o apoio na consulta farmacêutica, por exemplo.

Da FMF levo não só conhecimentos técnicos e científicos para a minha vida profissional em prol da sociedade, como também a importância de uma organização de trabalho de excelência, onde o rigor e a união de equipa fazem parte das suas bandeiras para uma dinâmica de trabalho distinguível, e com isso, servir as necessidades do utente com um acompanhamento personalizado. À equipa da FMF estarei eternamente grata, pela confiança que depositaram em mim, ciente do compromisso necessário para exercer esta honrosa profissão, ser Farmacêutico!

## 5. Referências Bibliográficas

1. **Farmácia Comunitária - Áreas Profissionais - Ordem dos Farmacêuticos**

Disponível em :<https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/>

2. Condinho, Monica & Fernandez-Llimos, Fernando & Figueiredo, Isabel & Sinogas, Carlos. (2015). Assessing the Effects on Clinical Outcomes of an Outsourced Pharmaceutical Care Service in Portuguese Community Pharmacies. **LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY**. 34. 782-9.

# **Parte II**

**Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar**  
**Serviços Farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia de**  
**Coimbra Francisco Gentil**

Sob orientação da Dra. Clementina Maria Atanásio Varelas



## **Abreviaturas**

<b>AO</b>	Assistente operacional
<b>AT</b>	Assistente técnico
<b>DT</b>	Distribuição tradicional
<b>DU</b>	Dose unitária
<b>FA</b>	Farmácia de ambulatório
<b>FH</b>	Farmácia hospitalar
<b>IPOCFG, E.P.E.</b>	Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, Entidade Pública Empresarial
<b>MICF</b>	Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>SF</b>	Serviços farmacêuticos
<b>SWOT</b>	Do inglês, <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>
<b>TSDT</b>	Técnico superior de diagnóstico e terapêutica
<b>UPC</b>	Unidade de preparação de citostáticos

## **I. Nota Introdutória**

A farmácia hospitalar (FH) é uma das saídas profissionais em atual reestruturação e expansão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), em que o farmacêutico desempenha um papel crucial na prestação de cuidados farmacêuticos. Sendo este o especialista do medicamento, é imprescindível a sua contribuição na aquisição racional e gestão de medicamentos, validação das prescrições médicas, distribuição pelos blocos e enfermarias, dispensa da terapêutica ao doente e respetivo seguimento, e monitorização dos ensaios clínicos<sup>1</sup>.

O estágio foi realizado nos serviços Farmacêuticos (SF) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, Entidade Pública Empresarial (IPOCFG, E.P.E), com a duração de 280 horas, e orientada pela Dra. Clementina Varelas, Diretora dos Serviços Farmacêuticos. A escolha da realização deste estágio no IPOCFG deveu-se sobretudo ao interesse em conhecer o papel do farmacêutico num hospital direcionado apenas para patologias do foro oncológico e adquirir mais conhecimentos da área de oncologia. O plano de estágio consistiu numa repartição pelos vários setores dos SF: Dose Tradicional (DT), Dose Unitária (DU), Farmácia de Ambulatório (FA), Unidade de preparação de citostáticos (UPC) e Medicina Nuclear.

Os serviços farmacêuticos do IPOCFG são compostos por uma vasta equipa multidisciplinar: 8 farmacêuticas, 11 técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica (TSDT) de farmácia, 1 assistente técnico (AT) e 6 assistentes operacionais/auxiliares (AO). Existe ainda a Comissão de Farmácia e Terapêutica (CFT), constituída por duas farmacêuticas e dois médicos, que surge da necessidade de aprovação de novas terapêuticas específicas e elaboração dos respetivos protocolos.

## 2. Análise SWOT

Este relatório assenta numa análise SWOT na qual são expostos, na tabela I, e descritos os pontos fortes (*Strengths*), pontos fracos (*Weaknesses*), englobados numa dimensão interna. Já numa dimensão externa são analisadas as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) experienciadas ao longo deste estágio.

**Tabela I:** Análise SWOT. Identificação dos pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças identificadas no decurso do estágio.

Pontos Fortes ( <i>Strengths</i> )	Pontos Fracos ( <i>Weaknesses</i> )
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Interligação entre diferentes profissionais de saúde;</li><li>➤ Integração nos diferentes setores dos serviços farmacêuticos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Realização de poucas atividades de índole farmacêutica;</li><li>➤ Uso de sacos de plástico na cedência de medicação ao doente.</li></ul>
Oportunidades ( <i>Opportunities</i> )	Ameaças ( <i>Threats</i> )
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Consolidação de conhecimentos dos diferentes grupos terapêuticos e a sua relação com a oncologia;</li><li>➤ Ação formativa sobre nutrição parentérica.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Escassez de recursos para uma otimização da monitorização no seguimento da terapêutica do doente.</li></ul>

### 2.1 Pontos Fortes (*Strengths*)

#### 2.1.1 Interligação entre diferentes profissionais de saúde

O farmacêutico é um profissional de saúde indispensável, não só na dinâmica da farmácia hospitalar, como nos restantes serviços de um hospital. É, portanto, fulcral a sua interligação com os restantes profissionais de saúde, sejam eles médicos, enfermeiros, TSDT, ou assistentes técnicos/operacionais. Essa dinâmica permitiu-me contactar com outros profissionais de saúde, e perceber a sua interligação e entreaajuda para assegurar o percurso do medicamento.

### 2.1.2 Integração nos diferentes setores dos serviços farmacêuticos

Ao longo do estágio passei pelos diferentes setores dos serviços farmacêuticos, onde contactei com as atividades e responsabilidades de cada um e a interligação entre eles. O meu primeiro contacto foi com o setor da distribuição tradicional, responsável pela reposição de *stocks*, principalmente de produtos de maior volume (nutrição, soros e produtos inflamáveis), pelos serviços clínicos do IPOCFG. É da responsabilidade do farmacêutico toda a gestão da medicação e contagem de *stock*, sendo esta assegurada de 15 em 15 dias. Além disso, os TSDT realizavam a visita semanal ao serviço de oncologia médica, para revisão de *stock*, prazos de validade e verificação das condições de armazenamento.

Ao contrário da distribuição tradicional, a distribuição em dose unitária é feita individualmente para os doentes de internamento para períodos de 24 horas, e para 72 horas à sexta-feira de modo a cobrir o fim de semana. Neste setor, a prescrição médica carece de validação pelo farmacêutico, que verificam possíveis interações, forma farmacêutica, dose, frequência e via de administração. De seguida os TSDT procedem à preparação individualizada da medicação com posterior conferência cruzada, para ser finalmente transportada ao respetivo serviço de internamento.

O setor de farmácia de ambulatório foi o setor onde pude realizar mais tarefas como a conferência de receituário, preparação da medicação e até contactar diretamente com o doente, fazendo alguns aconselhamentos na cedência da medicação, sempre acompanhada por uma farmacêutica. Por fim, nos últimos dias, visitei a unidade de preparação de citostáticos onde presenciei a validação de protocolos de quimioterapia venosa e posterior preparação pelos TSDT, e o serviço de medicina nuclear destinado à preparação de radiofármacos.

## **2.2. Pontos Fracos (Weaknesses)**

### 2.2.1 Realização de poucas atividades de índole farmacêutica

O estágio em farmácia hospitalar decorreu, predominantemente, em regime observacional. Tal facto, deve-se à responsabilidade exigidas pelas diferentes atividades farmacêuticas, essencialmente, por se tratarem de doentes oncológicos, e existirem tratamentos complexos. No entanto, considero que poderia haver uma reestruturação no plano de estágio e integração, no sentido de poder acompanhar mais as tarefas dos farmacêuticos como a validação de prescrições médicas e gestão de *stock* na distribuição tradicional, setores onde apenas acompanhei os TSDT.

### 2.2.2 Uso de sacos de plástico na cedência de medicação ao doente

Na cedência de medicamentos e nutrição ao doente eram usados, sobretudo, sacos de plástico para o seu transporte, o que se traduz numa prática pouco sustentável. Embora nalguns casos sejam necessários (medicamentos de frio e sensíveis à luz, por exemplo), substituí-los por sacos de papel, sempre que possível, seria uma boa prática ambiental a ser instituída.

## **2.3. Oportunidades (*Opportunities*)**

### 2.3.1 Consolidação de conhecimentos dos diferentes grupos terapêuticos e a sua relação com a oncologia

Ao longo do estágio, na DU foram-me propostos diversos trabalhos de pesquisa, tais como: avaliação da administração de medicamentos via sonda nasogástrica e compatibilidade de eletrólitos e fluidos na terapia de infusão. Da mesma maneira, em FA tive acesso a diferentes planos terapêuticos, sejam de hormonoterapia, quimioterapia *per os* e terapia de suporte (antieméticos e anti-infecciosos, por exemplo).

Além disso, visualizei o aconselhamento farmacêutico ao doente, onde era discutida a terapêutica no início do tratamento, complementada por perguntas ao doente e folhetos informativos, para este ficar mais elucidado. Posteriormente, no ato das próximas cedências era questionado a existência de efeitos secundários e avaliada a adesão à terapêutica.

### 2.3.2 Ação formativa sobre nutrição parentérica

O farmacêutico está na vanguarda da inovação farmacêutica, e por isso as formações contínuas são essenciais para a sua atualização. Nesse contexto, tive oportunidade de presenciar uma formação relativa a nutrição parentérica pela *Fresenius Kabi*. Este tipo de nutrição é uma via a considerar quando a ingestão oral ou a nutrição pela via entérica está comprometida, o que nos doentes oncológicos é frequente, sobretudo em casos de cancro da garganta ou no sistema gastro- intestinal. Assim, a via parentérica assegura as necessidades nutricionais destes doentes. Esta implementação deve ser acompanhada de uma intervenção multidisciplinar na qual o farmacêutico deve estar inserido.



## **2.4 Ameaças (Threats)**

### **2.4.1 Escassez de recursos para uma otimização da monitorização da terapêutica do doente**

Em farmácia de ambulatório, sector onde decorre a cedência de medicação prescrita, monitorização dessa mesma terapêutica e acompanhamento ao doente, a falta de privacidade era um obstáculo na comunicação entre farmacêutico-doente. Tal facto, deve-se à cedência ser feita sempre ao balcão em contacto com um corredor muito movimentado e onde existiam mais doentes em fila de espera o que resultava, muitas vezes, num constrangimento da pessoa que estava a ser atendida e desconforto em colocar questões. Esta situação foi agravada ainda mais pelas medidas de segurança contra a COVID-19.

A meu ver, o ato da primeira cedência e a exposição de dúvidas deveria ser feita em gabinete, garantindo um melhor acompanhamento do doente.

## **3. Caso Prático de Intervenção Farmacêutica**

No decorrer do estágio, principalmente em farmácia de ambulatório, era evidente a intervenção do farmacêutico na avaliação da adesão à terapêutica do doente, reações adversas relatadas pelo doente e conseqüente comunicação ao médico, se necessário. De seguida, é apresentada uma intervenção farmacêutica que evidencia a importância do farmacêutico no acompanhamento do doente em contexto hospitalar.

### **Caso Prático I**

Na cedência habitual de tamoxifeno para o tratamento do cancro da mama com recetores hormonais positivos, a doente referiu que lhe tinha sido prescrita fluoxetina pelo seu médico psiquiatra. Ora, a interação destes dois fármacos é evidente, uma vez que certos antidepressivos como a fluoxetina inibem a via CYP450 2D6, levando à diminuição do efeito do tamoxifeno. Assim, em contacto com a médica, foi-lhe sugerido a troca do antidepressivo por venlafaxina ou mirtazapina, antidepressivos com baixo potencial em inibir a via CYP450 2D6. Todavia, foi recomendado à doente o contacto com o seu médico psiquiatra para esclarecimento do caso.

#### **4. Considerações Finais**

O farmacêutico hospitalar exerce o papel um indispensável e insubstituível do farmacêutico na dinâmica do circuito do medicamento. Este profissional de saúde é altamente diferenciado e qualificado para exercer o acompanhamento direto no suporte terapêutico ao doente. De forma a que este profissional progrida e passe a desempenhar funções mais centradas na clínica e no doente foi essencial a aprovação da carreira farmacêutica hospitalar, que irá formar farmacêuticos especialistas nas áreas de análises clínicas, farmácia hospitalar ou genética humana<sup>2</sup>.

Concluído o estágio em farmácia hospitalar no IPOCFG, saliento a enorme responsabilidade do farmacêutico hospitalar, que muitas vezes passa despercebida, mas que tem um forte impacto da saúde do doente. Além disso, realço a necessidade dos farmacêuticos em funções como a gestão, controlo, produção, validação e cedência da medicação, cujas intervenções ficariam muito comprometidas sem a presença destes.

É certo que o farmacêutico hospitalar ainda tem um longo caminho a percorrer, e este deve exigir o reconhecimento da sua profissão, dada a sua inegável contribuição na otimização dos cuidados de saúde.

## **5. Referências Bibliográficas**

**1. Farmácia Hospitalar - Áreas Profissionais - Ordem dos Farmacêuticos**

Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-hospitalar/>

**2. CLÍNICAS, Análises - GUIA DO FARMACÊUTICO RESIDENTE**

# **Parte III**

## **Monografia**

**“Whole-sporozoite vaccines against malaria: Current approaches and future prospects based on genetically modified *Plasmodium berghei* sporozoites”**

Sob orientação da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro

## Abbreviations

<b>CeITOS</b>	Cell-Transversal protein for ookinetes and sporozoites
<b>CHMI</b>	Controlled human malaria infection
<b>CPS</b>	Chemoprophylaxis and Sporozoite
<b>CSP</b>	Circumsporozoite protein
<b>DBP</b>	Duffy binding protein
<b>DiCo</b>	Diversity-covering
<b>EA-GAP</b>	Early-arresting GAP
<b>GAP</b>	Genetically attenuated parasites
<b>GIMO</b>	"Gene insertion/marker out"
<b>GLA-SE</b>	Glucopyranosyl lipid adjuvant stable emulsion
<b>HMP</b>	Human malaria parasite
<b>IFA</b>	Immunofluorescence assay
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G
<b>IgM</b>	Immunoglobulin M
<b>IRS</b>	Indoor residual spraying
<b>ITNs</b>	Insecticide-treated mosquito nets
<b>LA-GAP</b>	Late-arresting GAP
<b>LSA I</b>	Liver-stage antigen I
<b>LSAP2</b>	Liver-stage-associated protein 2
<b>LSM</b>	Larval source management
<b>MPL</b>	Monophosphoryl lipid A
<b>NK</b>	Natural killer
<b>PbA</b>	<i>P.berghei</i> ANKA
<b>PEVs</b>	Pre-erythrocytic vaccines

<b>PfAMA1</b>	<i>Plasmodium falciparum</i> apical membrane antigen 1
<b>PfSPZ</b>	<i>Plasmodium falciparum</i> sporozoites
<b>PfSPZ-CVac</b>	PfSPZ-Chemoprophylaxis Vaccine
<b>Pvs25</b>	<i>P. vivax</i> ookinete surface protein
<b>qPCR</b>	Quantitative polymerase chain reaction
<b>QS-21</b>	<i>Quillaja saponaria</i> Molina fraction 21
<b>RAS</b>	Radiation-attenuated sporozoites
<b>RBCs</b>	Red blood cells
<b>TRAP</b>	Thrombospondin-related adhesive protein
<b>WHO</b>	World Health Organization

## Abstract

Malaria is an infectious potentially-lethal disease caused by the *Plasmodium* parasite. Despite all the efforts, it hasn't been possible so far to achieve the ideal immunization approach and the eradication of this disease seems far away.

Several vaccines targeting the different stages of malaria life cycle have been developed, and the pre-erythrocytic vaccines report the best results. Despite the approval of the RTS,S subunit vaccine and its potential implementation in endemic areas, the results in terms of efficacy and long-lasting protection is not as good as desired.

Whole-sporozoite vaccines are able to solve some obstacles of subunit vaccines. This document aims to describe the current whole-sporozoite vaccines approaches and a new strategy based on the rodent parasite *Plasmodium berghei* genetically modified. This recent approach has shown very promising results in inserting selected antigens to establish immunity against the parasites that currently most infect humans and can cause severe disease (*Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*).

**Keywords:** Immune response; Malaria vaccine; *Plasmodium berghei*; Vaccine targets; Whole-sporozoite vaccines.

## Resumo

A malária é uma doença infecciosa causada pelo parasita pertencente ao género *Plasmodium*. Apesar de todos os esforços feitos no desenvolvimento de uma vacina eficaz, a vacina desejada ainda não foi alcançada e a erradicação da doença parece estar muito longe.

Várias vacinas direcionadas às diferentes fases do ciclo de vida da malária têm sido desenvolvidas, e são as vacinas da fase pré-eritrocitária que relatam melhores resultados. Apesar da aprovação da vacina da subunidade RTS,S e da sua potencial implementação em áreas endémicas, os resultados em termos de eficácia e de proteção duradoura não são tão bons quanto desejado.

As vacinas de organismo inteiro conseguem resolver alguns obstáculos das vacinas de subunidade. Este documento visa apresentar as atuais abordagens das vacinas de organismo inteiro e uma nova estratégia baseada no parasita de roedores *Plasmodium berghei* geneticamente modificado. Esta recente abordagem revelou resultados muito promissores na inserção de antigénios seleccionados para o estabelecimento de imunidade contra os parasitas que, atualmente, mais infetam humanos e que podem provocar doença severa (*Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*).

**Palavras-chave:** Resposta imunitária; Vacina contra a malária; *Plasmodium berghei*; Alvos de vacinação; Vacinas de organismo inteiro.



## I. Introduction

Malaria is a mosquito-borne infectious disease, transmitted by the bite, of protozoan parasites of the genus *Plasmodium*<sup>1</sup>. The term "malaria", from the Italian *mala aria* ("bad air"), is associated with the belief that the disease, known at the time as "swamp fever" was caused by harmful fumes from the swamps were responsible for the illness. The parasite responsible for the infection were discovered in 1880<sup>2</sup>.

The threat is real, half of the world's population is at risk of malaria infection<sup>3</sup>. Although there has been a significant reduction since 2000 (from 82 in 2000 to 57 in 2019, cases per 1000 population), 241 million clinical cases of malaria occurred in 2020, and 627 000 people died of malaria. According to the World Health Organization (WHO), the mortality is significantly higher in children, but the target population includes all age groups, as well as immunocompromised and pregnant women, with the highest incidence in sub-Saharan Africa.<sup>4; 5; 6</sup>

Clinically, it presents as an acute febrile syndrome, with paroxysmal high fever, diaphoresis, headache and asthenia, frequently accompanied by gastrointestinal symptoms. Severe malaria is often lethal if not promptly treated. The patients show signs of severe cytopenia and various manifestations of multi-organ damage, including central nervous system involvement<sup>7</sup>.

The malaria eradication goal is supported by several prevention and treatment measures implemented by WHO. However, these measures do not seem to be sufficient, and mass immunization is needed, especially in endemic areas. Malaria vaccines have been in development since the 1960s, with substantial progress in the last decade. Several vaccines for different stages of the parasite life cycle are in advanced studies, but none have yet ensured the elimination of malaria. The RTS, S/AS01 (RTS,S) is the first malaria vaccine recommended by WHO. The efficacy and safety of this vaccine is far from desirable and therefore research groups are strongly motivated and encouraged to develop and test other vaccines<sup>8</sup>.

The issue is so important that the WHO has set a target of a 75% effective vaccine by 2030<sup>9</sup>. To this end, strategies have been developed to design a highly safe and effective vaccine, including whole-sporozoite vaccines, most recently those based on the rodent parasite *P. berghei*, to overcome some of the intrinsic barriers to subunit vaccines<sup>10</sup>.

## 2. Malaria

### 2.1. Epidemiology and etiology

Malaria is caused by the bite of an infected female *Anopheles* mosquito vector<sup>11</sup>. There are about 40 species of *Anopheles* mosquitoes that are malaria vectors. Malaria parasites are of the genus *Plasmodium*, which belongs to the phylum Apicomplexa, a taxonomic group of single-celled and obligate intracellular parasites<sup>12</sup>.

This widespread disease is caused by five parasite species from the genus *Plasmodium* that infect humans: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium knowlesi* (zoonotic parasite). *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* are two rodent infective parasites used for *in vivo* and *in vitro* laboratory studies<sup>3; 13</sup>. Although *P. falciparum* causes the highest malaria-related mortality, *P. vivax* is now the most widespread of all malaria species and can cause severe and fatal infections, resulting in significant global morbidity and mortality. In the dormant liver phase of *P. vivax*, such reservoirs are not detectable, resulting in recurrent infections and sustaining mainly asymptomatic transmission. Beyond that, its early gametocytogenesis and shorter development cycle in the vector are considered an obstacle to the elimination of *P. vivax*<sup>14; 15; 16</sup>.

Transmission occurs mainly in tropical and subtropical areas, due to a combination of factors, like the existence of conditions for the *Anopheles* mosquitoes to survive and multiply, climatic conditions (temperature, humidity, and rainfall), scarce resources, and social-economic instability (typically in poor and developing countries)<sup>3</sup>.

A detailed understanding of the life cycle of the parasite and its dynamics, the implementation of preventive measures, including the RTS,S vaccine, which is far from 100% effective but that can complement the other measures, all together have been the main control tools in reducing the global burden of this disease.<sup>9</sup>

### 2.2. *Plasmodium* life cycle

It's crucial to know in detail the life cycle of the malaria parasite because it is the starting point for the various therapeutic strategies to control the parasite and prevent infection.

The *Plasmodium* life cycle is heteroxenous and involves two hosts: the biological vector (mosquito) and the human host. It is initiated when an infected female *Anopheles* mosquito bites a human, to feed on blood<sup>17</sup>. This process is facilitated by vasodilators and anticoagulants

in the mosquito's saliva<sup>18</sup>. As a result, the sporozoites, infectious parasitic forms incorporated in the salivary glands, are deposited into the skin until they cross the blood vessels, enter the circulatory system and reach the liver, where the sporozoites leave the sinusoids by crossing Kupffer and fenestrated endothelial cells and enter a hepatocyte, forming a parasitophorous vacuole membrane, and the exo-erythrocytic stage begins<sup>19; 20; 21</sup>. Here the sporozoites multiply asexually and differentiate into trophozoites, which undergo hepatocytic schizogony, forming schizonts that later rupture, releasing merozoites into the bloodstream<sup>22</sup>. It should be noted that the sporozoites of the *P. vivax* and *P. ovale* species can remain dormant in the liver (hypnozoites) and only develop later<sup>17</sup>.

This is followed by the erythrocyte stage, in which the merozoites invade red blood cells (RBCs), multiply asexually and mature through the process of erythrocyte schizogony, leading to the development of ring-stage trophozoites, which mature into schizonts that rupture, releasing merozoites. It is at this stage that the clinical symptoms begin<sup>22</sup>. Some of these merozoites can differentiate into gametocytes (the form responsible for sexual reproduction), initiating the process of gametogenesis. In the midgut of the mosquito, the microgametes (male gametocytes) fuse with the macrogametes (female gametocytes) to form the zygote. This zygote becomes an ookinete within 24 hours, gains motility and elongates, invades the midgut wall of the mosquito, and transforms into oocysts, where asexual sporogonic replication of sporozoites occurs. The oocysts rupture and migrate to the salivary glands, where the sporozoites are again inoculated into a new human, restarting the malaria cycle<sup>17; 23</sup>. The life cycle of the malaria parasite is illustrated in figure 1.

### **2.3. Prevention tools and strategies**

Over the last two decades, malaria control and elimination have been based on early diagnosis, disease treatment, and vector control. Despite all the attempts and research aimed at improving the prevention, diagnosis, and management of malaria, it still lacks an effective and long-lasting vaccine against this infectious parasite<sup>24</sup>. This fact, combined with the rapid spread of mosquito resistance to currently available insecticides and drugs are among many challenges that affect the widespread implementation of malaria control. Vector control has always been the most effective measure to prevent malaria transmission. This strategy consists mainly of insecticide-treated mosquito nets (ITNs), indoor residual spraying (IRS) with insecticides, and the supplementary strategy of larval source management (LSM); along with access to diagnostic facilities and improved treatment as well as surveillance, monitoring, and evaluation, including entomological surveillance<sup>25; 26</sup>. A vector control intervention should be

based on and adapted depending on local transmission dynamics<sup>26</sup>. For that, adequate health infrastructure, accurate knowledge of prevailing vectors, socio-political commitment, deploying region-specific intervention strategies, and involving local communities in malaria reports, research, and elimination are required for the effective implementation of malaria control programmes<sup>27; 28</sup>. No control intervention can singly eradicate malaria. Control interventions need to be implemented simultaneously and, in addition, the need for cost-effective and time-effective measures dictates the need for a malaria vaccine.<sup>26; 29</sup>

### **3. Malaria Vaccines and actual challenges**

The development of an effective and long-lasting vaccine against malaria is a key priority to reduce the burden and transmission of the disease<sup>30</sup>.

There are many challenges to developing a vaccine against the malaria parasite, including a complex life cycle with two reproductive stages in two hosts (sexual in the mosquito and the asexual in the human), multistage and antigenic variability<sup>31</sup>. The parasite can evade the immune system by constantly changing its surface. This makes the development of a vaccine very difficult<sup>3</sup>. Improving antibody levels, as well as CD4+T cells, and CD8+T cells, which are critical for long-term protection because they are responsible for differentiating into memory T cells, is one of the challenges of vaccination. Yet, as with any other disease, we are faced with heterogeneity in host response and disease exposure in areas of high transmission, which may skew the results of vaccine efficacy<sup>32</sup>.

Other issues include the inability to maintain human parasites in culture, such as *P. vivax*, for which protection would need to be obtained as it is gaining more and more transmission strength, so it is critical to find a vaccine that induces immune responses against this human parasite<sup>33</sup>. Also, socio-economic barriers, particularly in endemic areas in developing countries, can present obstacles to good vaccine maintenance practices, so a vaccine that is easy to administer and maintain is an asset<sup>34</sup>.

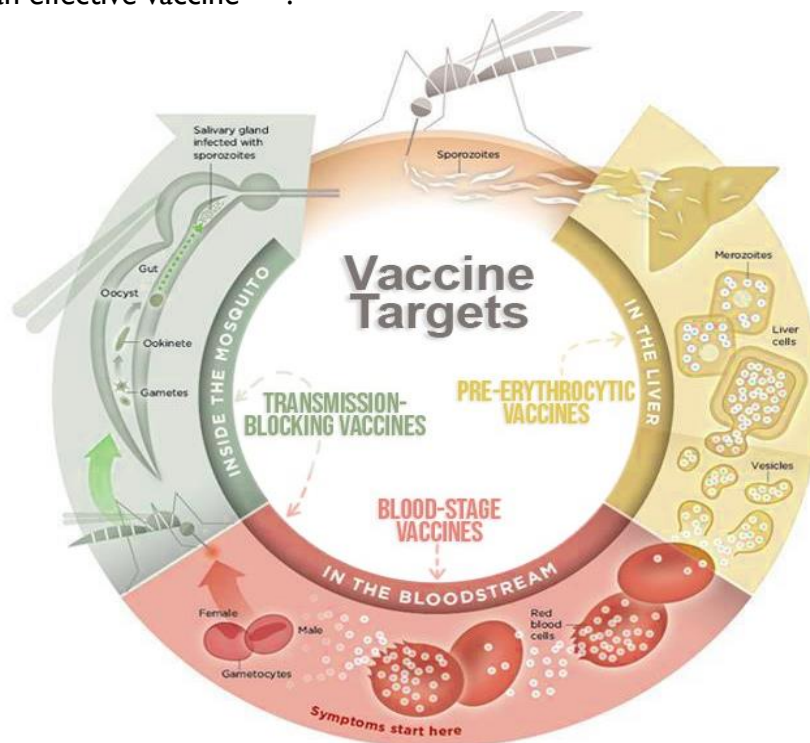
The development of vaccines against this parasite aims to address the challenges mentioned above and many others that remain unresolved. Vaccines have been developed covering the different stages of the parasite, and more recently this was been complemented by research into new antigens at the different stages and adjuvants capable of enhancing beneficial innate immune recognition and activation<sup>32</sup>

Some of them are directed at the invasion phase of the parasite and the liver phase -pre-erythrocytic vaccines; some on the asexual erythrocytic stages- blood-stage vaccines; and others on the sexual erythrocytic stage -transmission blocking vaccines<sup>32</sup>.

### 3.1. Vaccine Targets

A malaria vaccine must provide broad protection against different polymorphic variants to prevent escapes<sup>35</sup>. This involves inducing different forms of immunity that target specific parts of the parasite's life cycle. (Figure 1)<sup>36</sup>.

Several approaches suggest that the pre-erythrocytic stage is the most attractive strategy for developing a long-lasting vaccine as a preventive and imperative tool for optimizing other malaria control strategies. The aim of acting in this stage is to limit RBC invasion, inhibiting infections, and hepatic parasite development<sup>37</sup>. If the parasites are blocked at this stage, which is obligatory and asymptomatic, not only prevents progression to symptomatic blood infection but also prevents parasite transmission<sup>32</sup>. Nonetheless, pre-erythrocytic vaccines also have some limitations. One concern is the fact that only a few parasites are needed to escape protection for blood-stage malaria to develop. In addition, the high polymorphism of most candidate pre-erythrocytic antigens, such as circumsporozoite protein (CSP) and thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), limits the success of developing an effective vaccine<sup>38; 39</sup>.



**Figure 1:** Vaccine targets according to malaria parasite life cycle. (Adapted from PATH malaria vaccine initiative)<sup>40</sup>.

The second promising vaccine target are the antigens present in the blood-stage of the parasite. They are responsible for eliciting immune responses that will block merozoite invasion of red cells and stop asexual blood-stage replication, thus suppressing the symptomatic and clinical stage, because of the significant reduction in parasitemia in the blood-stage<sup>41</sup>. It's an asset in escape situations where sterile immunity is not achieved, and it's an advantage over pre-erythrocytic vaccines<sup>32</sup>. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen I (PfAMA1) is the most studied antigen for a potential candidate vaccine of the blood-stage and is directly linked to the inhibition of RBC invasion by merozoites. The efficacy of vaccines at this stage depends largely on induced antibodies against the target antigens, and therefore the genetic diversity of the antigens, such as PfAMA1, is an obstacle to the development of an effective vaccine. To induce the production of these antibodies, the adjuvants alhydrogel and glucopyranosyl lipid adjuvant stable emulsion (GLA-SE) were combined to form the diversity-covering (DiCo) PfAMA1 vaccine, but the results revealed the need for stronger adjuvants<sup>42;</sup>  
<sup>43</sup>.

Finally, transmission-blocking vaccines aim to reduce transmission, by acting directly on the host mosquito to block the sexual stages<sup>44; 45</sup>. Defined antigens expressed in gametocytes, gametes, zygotes, and ookinetes, induce antibodies and prevent the development and maturation of the parasite in the mosquito midgut. This results in a reduction in infected mosquitoes and transmission to humans<sup>44</sup>. The Pfs230, Pfs45/48 proteins expressed on the surface of parasite gametocyte stage in humans and the Pfs25/28 protein expressed in the mosquito midgut in zygotes and ookinetes, are leading candidates for a transmission-blocking vaccine<sup>44; 45</sup>. Despite the induction of antibodies, their levels are not as high as desired<sup>46</sup>. The search for other candidate antigens, as well as their fusion, such as Pfs230-Pfs45/48 and complementing the vaccine formulation with adjuvants such as Matrix- M, or de combination with pre-erythrocytic vaccines may be of interest to enhancing immunogenicity<sup>47; 48</sup>.

Overall, considering these developments, the focus on developing pre-erythrocytic vaccines is evident, as their early target prevents not only blood infection but also parasite transmission, and indeed they are the only ones that can achieve sterile protection.<sup>30; 44</sup>

## 4. Pre- erythrocytic vaccines

Pre-erythrocytic vaccines (PEVs) have shown the most success in limiting clinical malaria infection because, by acting at this stage, they prevent parasite blood dissemination<sup>49</sup>. In this way, it will prevent the merozoites from invading the RBC, and consequently, break the chains of transmission<sup>35</sup>. Another advantage is that the number of the parasites before blood-stage is lower, and for that, blocked parasites in the asymptomatic stage make this strategy attractive<sup>50</sup>. Pre-erythrocytic vaccines can induce both antibody and T-cell mediated responses, that are responsible for targeting parasites and infected hepatocytes in the liver, so the antibody response blocks sporozoite migration to the liver<sup>32</sup>. For all these reasons, the pre-erythrocytic stage of infection is the ideal target strategy for immunization against clinical malaria.

In the literature, is possible to find several pre-erythrocytic vaccination approaches, which can be divided into two main groups: subunit vaccines and whole-sporozoite vaccines<sup>51</sup>. The most evident difference is that while subunit vaccines are based on well-defined parasite antigens, whole - sporozoite vaccines involve whole- attenuated sporozoites, and therefore, they contain all antigens of the parasite<sup>51</sup>.

### 4.1. Subunit vaccines

Subunit vaccines consist of a single or a combination of parasite antigens and consequently, the induced immune responses are limited by a restricted number of epitopes present in the parasite<sup>52</sup>. These vaccines are designed as peptides, multi-peptide constructs, or recombinant proteins, containing B and T cell epitopes, and the formulation includes adjuvants to improve immunogenicity<sup>53;54</sup>. The design and production of subunit vaccines are relatively easy, resulting in large-scale peptides with high purity, and therefore less likelihood of side effects. The adaptation of the vaccine to specific immune responses and the fact that administration to immunosuppressed patients is possibly, makes this type of vaccine, at first glance, more desirable. Moreover, the fact that they can be lyophilized and stored at room temperature in dry form allows for facilitated transport and storage in endemic areas, which often encounter logistical obstacles<sup>55; 56</sup>.

The design of effective subunit vaccines is often hampered due to highly polymorphic T-cell epitopes, CS and TRAP, and consequently, there is a lack of cross-reactivity between immunodominant polymorphic T-cell epitopes, important for the induction of immune responses<sup>39; 57</sup>

Despite low immunogenicity is the main drawback of peptide-based vaccines, advances are being made to improve it, through adjuvants and protein-protein conjugation strategy (chemical conjugation of antigens to carrier proteins, for example)<sup>58; 59</sup>.

The CSP is the main target of subunit vaccines and in this context emerged a CSP -based RTS, S/AS01 recombinant protein vaccine (*Mosquirix*<sup>TM</sup>), the first vaccine recommended by WHO<sup>32</sup>.

### RTS,S/AS01 vaccine (*Mosquirix*<sup>TM</sup>)

RTS, S is a subunit vaccine that consists of a *P. falciparum* CSP fragment fused to the hepatitis-B surface antigen (a virus-like particle) and with AS01 adjuvant based on liposomes containing two immunostimulants monophosphoryl lipid A (MPL) and *Quillaja saponaria* Molina fraction 21 (QS-21), which contribute synergistically to the adjuvant effect of AS01. Together, they induce the immune system to produce increased amounts of antibodies and T CD4+ cells<sup>49; 54; 60</sup>. Several years of vaccination studies have proven that RTS, S induces immune responses with adequate safety and, therefore, the evaluation of the ongoing benefit-risk profile in real life will dictate its implementation in sub-Saharan Africa regions<sup>61</sup>.

Although subunit vaccines have the logistical issues facilitated, long-lasting efficacy is not as expected<sup>32</sup>. The effectiveness rate of RTS, S is not sufficient and prevalent over time. For this reason, successive immunizations are necessary. Furthermore, it does not induce CD8+ T cell responses, and is not able to induce protective responses against human malaria parasites other than *P. falciparum*<sup>48; 59</sup>.

Despite the licensing of the RTS, S, this achievement cannot be seen as an effective solution, but rather as a step towards achieving protective and durable efficacy of at least 75 percent against clinical malaria<sup>63</sup>. In this sense, whole-sporozoite vaccines seem to solve some of these obstacles and are considered by many authors as the vanguard for a safe vaccine, highly protective and capable of providing adaptive immune responses that protect against different *Plasmodium* species in humans<sup>32</sup>.

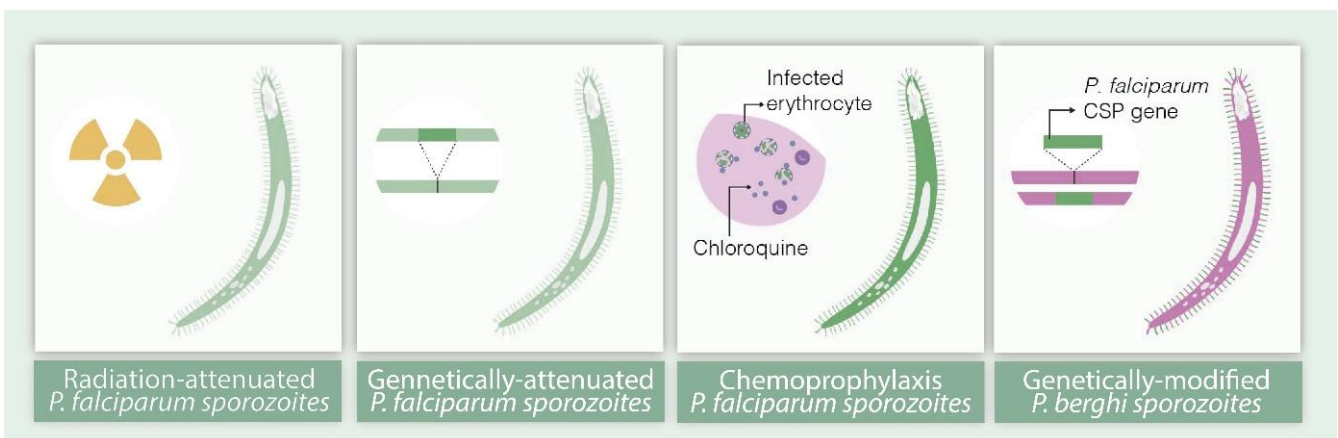


## 4.2. Whole - sporozoite vaccines: current approaches

Whole - sporozoite vaccines have emerged over the last five decades, since the first demonstration in humans, by Clyde in 1973, using radiation-attenuated *P. falciparum* sporozoites have demonstrated induced protective immunity against homologous *P. falciparum* malaria <sup>64</sup>.

In contrast to subunit vaccines, whole-sporozoite vaccines exhibit several antigens to the host immune system and have been outstanding for their effectiveness, eliciting strong immune responses <sup>65</sup>.

There are different ways of immunization using live or attenuated *P.falciparum*: 1) sporozoites attenuated by X-radiation (RAS), that prevent intra-hepatic parasite replication ; 2) genetically attenuated parasites (GAP), based on depletion of specific genes; 3) administration of wild-type parasites under chemoprophylaxis (CPS), and 4) genetically modified *Plasmodium berghei* sporozoite (Figure 2) <sup>65; 68</sup>.



**Figure 2:** Strategies of immunization using whole-sporozoite to induce immune responses. (Adapted from NUNES-CABAÇO, Helena *et al*, 2022) <sup>10</sup>.

### Radiation-attenuated sporozoites (RAS)

Radiation-attenuated sporozoites, previously considered the “gold standard”, was the first landmark achievement in the development of whole-sporozoite vaccines against malaria. It was in 1967 when is achieved the first demonstration that mice could be protected against rodent malaria, by the administration of a vaccine containing irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei* <sup>69</sup>. It's a promising way to stop parasite development in the liver by preventing replication and progression to the blood stage. Appropriate ionizing radiation (ultraviolet radiation, X-ray, and  $\gamma$ ) induces deoxyribonucleic acid (DNA) damage and downregulation of

DNA repair genes. In addition, parasites can maintain its metabolic activity, with its ability to infect liver cells and induce the immune system to express T cells and antibody responses<sup>70:71</sup>.

Already in the 21st century, the *Pf*SPZ vaccine was developed by Sanaria, based on aseptically purified, metabolically active, irradiated, cryopreserved sporozoites of the NF54 strain, administered intravenous route. Nevertheless, some of the disadvantages include the large number of parasites required, problems in defining and achieving the optimal dose for protection and the need to transport and cryopreserve the vaccine in liquid nitrogen. Despite this, it was a great advance for prospects of whole-sporozoite vaccines<sup>72:73</sup>.

### Genetically-attenuated parasites (GAP)

Genetically-attenuated parasites were designed to delete specific genes that are essential for the parasite's intrahepatic development<sup>74</sup>. These modified sporozoites can invade hepatocytes, but their intrahepatic development is compromised<sup>75</sup>. It is known that late genes induce a greater immune response, and due to it, a late-arresting GAP (LA-GAP) may increase protective immunity, because elicit a larger diversity and magnitude of antigens to the immune system<sup>65:69</sup>. The *Pf*SPZ-GAI consists of the deletion of the *b9* and *slarp* genes, which resulted in weak sterile protection, but was a landmark in assessing the efficacy of a *P. falciparum* GAP vaccine. Furthermore, LA-GAP, such as *Pfmei2*<sup>-</sup>, has induced higher levels of protective immune responses than early-arresting GAP (EA-GAP)<sup>76:77</sup>.

### Chemoprophylaxis and Sporozoites (CPS)

CPS immunization consists of a combination of antimalarial drugs (chemoprophylaxis) with wild-type parasites<sup>78</sup>. This approach allows the progression of the sporozoites through the liver stages, for them to be eliminated before the exit or just after the rupture of merozoite schizonts into the blood-stage, preventing erythrocytic infectious by the circulating antiplasmodial compound<sup>78</sup>. An advantage of CPS over RAS and GAP is the enhanced immunogenicity, even humoral immune responses against blood-phase antigens when the infection is aborted there. It also requires a lower number of parasites to achieve efficacy<sup>52</sup>. The latter is explained by the fact that non-attenuated sporozoites can complete the hepatic stage and replicate 10 to 40 thousand times more, and consequently present a greater quantity of antigens, giving more extensive and powerful protection<sup>79</sup>. The first drug to show significant protection was chloroquine, a parasiticide that acts in the asexual blood-stage<sup>80</sup>. The *Pf*SPZ-

Chemoprophylaxis Vaccine (PfSPZ-CVac) corresponds to the administration of non-attenuated *P. falciparum* sporozoites maintained wrapped in aseptic, purified, and cryopreserved compound (PfSPZ Challenge) under chloroquine prophylaxis (chemoprophylaxis and sporozoites)<sup>81</sup>.

Overall, preclinical and clinical studies have shown that RAS, GAP, and CPS are in most cases safe and capable of inducing cellular and humoral immunity, although better answers are needed<sup>82</sup>. Controlled human malaria infection (CHMI) is still used nowadays in some studies to test the protective efficacy of vaccine candidates, using a natural route of infection: the bite of *Plasmodium*-infected mosquitoes<sup>66</sup>. As an alternative to mosquito bites, Sanaria Inc. has developed the “PfSPZ Challenge”, an intravenous injection of aseptic, vialled, infectious, and cryopreserved but not irradiated *P. falciparum* sporozoites, also based on CHMI. This facilitates the estimation of optimal doses and the control of inoculation.<sup>67</sup> Despite all the knowledge about protective mechanisms that has been generated around the whole-sporozoite vaccination and the many challenges that have been successfully resolved, there are still major hurdles to overcome. The main challenges remain the lack of protection against *P. vivax* and safety concerns. The main associated safety issues include: the need for large numbers of immunizing parasites to arrest the early liver stage in RAS; the genetic revertants in GAP that can provoke disease; the administration of live and unattenuated *P. falciparum* sporozoites; and the emergence of antimalarial resistance in CPS<sup>82; 83</sup>. The ideal approach to the human malaria immunization would be to use a non-pathogenic parasite for that induces sterile long-lasting effective protection with security assured, practical to be implemented in endemic regions, and elicits heterologous protection against *P. falciparum*<sup>84; 85</sup>.

## **5. A new approach of attenuation: genetically modified *Plasmodium berghei* sporozoites**

This strategy is based on principles from the origins of vaccination when Edward Jenner unknowingly established the notion of cross-species protective immunization with cowpox, a bovine poxvirus (non-pathogenic in humans) to protect against subsequent infection with smallpox<sup>86; 87</sup>.

The *P. berghei* parasite has been used as an attractive study model in many investigations and developments of whole-sporozoite malaria vaccines<sup>88</sup>. This was improved when in 1969 A/J mice were inoculated with x-irradiated *P. berghei* sporozoites, resulting in protection not only

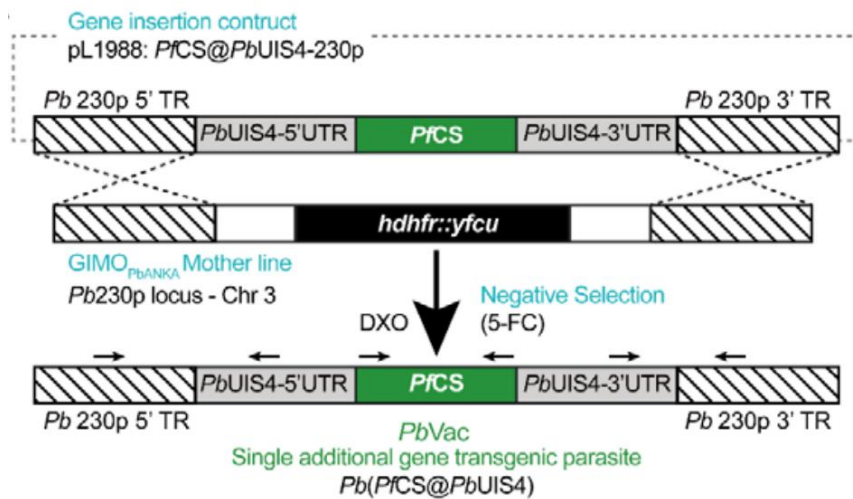
against *P.berghei* but also against *P.vinckei* sporozoites, reflecting the induction of cross-protective immunity. Thus, the interest in using this rodent parasite in the exploitation of whole-sporozoite malaria vaccines arose, which started to be explored as a platform to present selected antigens to provoke targeted and effective responses against human parasites<sup>89</sup>.

The interest in this rodent parasite is justified by its dynamics in the human host, its genetic similarity, and the immune responses generated against *P.falciparum*. On the one hand, *P.berghei* has a life cycle identical to that of the species that infect humans; on the other hand, it is harmless to humans, *id est* it infects human hepatocytes, a prerequisite for optimal antigen stimulation, but cannot infect RBC, thus not causing the disease<sup>90</sup>. Besides being safer than *P.falciparum*, the genome of *P.berghei* ANKA (*PbA*) has a high antigenic similarity (more than 60 % between species) to the *P.falciparum* 3D7 clone<sup>91</sup>. Also, *P.berghei* is prone to generate full-length *P.falciparum* proteins that are correctly folded: a greater diversity of antibody responses compared to those induced by the subunit<sup>90</sup>.

Hence comes the idea of creating a genetically modified vaccine against *P.berghei* sporozoites with different antigens expressed during the pre-erythrocytic stages, highlighting the potential for cross-protection between the two species.<sup>90</sup> Proteins with shared epitopes include several antigens expressed in the pre-erythrocytic phase, including SLARP, SIAP1, LISPI, and MB2. However, there are *P.falciparum* proteins without shared epitopes. To solve this problem, *P.berghei* has the advantage of being amenable to genetic manipulation, and several neutral loci have already been identified in its genome, increasing the possibility of inducing antigens of different stages using the "gene insertion/marker out" (GIMO) method. This method of transfection consists on the insertion of human malaria parasite (HMP) proteins in a rodent genome, *P.berghei* (the most commonly used) or *P.yoelii*, in which they are absent<sup>90</sup>.

GIMO transfection is based on the insertion of an addition gene into a silence/neutral locus, 230p or sI locus, under the control of different promoters. Before this insertion, it needs to integrate the selectable marker cassette of the neutral locus. Then, the HMP gene replaces the *hdhfr::yfcu* cassette, resulting in a transgenic parasite<sup>92, 93</sup>.

The PfCSP is the most abundant protein on the surface of sporozoites and is the major immunogen in the whole-sporozoite vaccination, but is devoid of epitopes shared with *P.berghei*. Based on this described genetic engineering method, a vaccine has been developed that expresses PfCSP on the surface of the *P.berghei* platform against the human-infective *P. falciparum* CS gene, resulting in a chimerical parasite<sup>90; 94</sup>. This vaccine (*PbVac*) expresses both *PbCSP* and *PfCSP*, and the insertion of the *PfCS* gene is inserted by GIMO into a neutral 230p locus of *P.berghei* under the control of a specific promoter sequence (UIS4 promoter, in this case, which is strictly pre-erythrocytic) (Figure 3)<sup>92</sup>.



**Figure 3:** Representation of transgenic *PbVac* line using the GIMO transfection method. (Adapted from MENDES, António M. *et al*, 2018)<sup>95</sup>. GIMO insertion construct (pL1988), which contains *PfCS* coding sequence, is integrated into 230p locus under the control of UIS4 promoter, by double cross-over homologous recombination, replacing stable *hdhfr::yfcu* selectable marker on the chromosome 3, after negative selection with 5 -fluorocytosine, an antifungal drug that kills all parasites expressing *yfcu*, generating a transgenic *P.berghei* line (*PbVac*), which that expresses *PfCS*<sup>92; 95</sup>.

### 5.1. *PbVac*: Safety, Efficacy, and Immunological assessment

The preclinical studies demonstrated that the *PbVac* comply the basic immunization requirements. Besides being able to invade human hepatocytes (in vitro) and liver-humanized mice (in vivo), *PbVac* was unable to reach the blood-stage and induce disease symptoms. In terms of immune responses, it was able to induce both cellular cross-species and humoral responses (antibodies), capable of blocking infection by *P.falciparum* sporozoites. Accordingly, the preclinical results have allowed the advancement to the evaluation of the clinical efficacy of *PbVac*<sup>88; 96</sup>.

In an open-label phase 1/2a trial, 24 volunteers, healthy malaria naïve adults, were enrolled into three study groups and one group of control, receiving 5, 25, and 75 *PbVac*-infected

mosquito bites (bites of mosquito with the parasite genetically modified) in the three study groups, respectively. Group 3 has undergone 4 immunizations (approximately 300 *PbVac*-infected mosquitoes), before *P.falciparum* CHMI by 5 *P.falciparum*-infected mosquitoes, 3 weeks after the last immunization in group 3, and in the control group (nonimmunized)<sup>96</sup>.

The first objective was to determine the safety and tolerability of *PbVac* administration by infectious mosquito bites. It was used daily samples collected in phase 1; and on days 1 and 8 after immunization during phase 2, applying retrospective *P.berghei* quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analyses<sup>96</sup>. The results showed no breakthrough infections and no serious adverse events (grade 3) after approximately 300 *PbVac*-infected mosquito bites<sup>96</sup>. Only local adverse events and moderate systemic adverse events (such as headache and nausea) were reported. Hence, the published results ensure that *PbVac* is safe and well tolerated<sup>96</sup>.

Despite no sterile protection was observed, *PbVac* immunization led to a significant increase in the prepatent period (time to parasitemia) and a decrease in parasite density. It was estimated an average decrease of 95% in liver parasite burden for immunized volunteers<sup>96</sup>. Humoral responses induced by whole-sporozoite vaccines are mostly dependent on *PfCS*<sup>97</sup>. Using an immunofluorescence assay (IFA), an increase in antibody response was observed, reflected by a sharp rise in immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG). *P.falciparum* significantly lose their ability to infect human hepatic cells at a significant extent (61%). This is justified by the fact that *P.falciparum* sporozoites are efficiently recognized by antibodies triggered through immunization. It is further added that the titers of anti-*PfCSP* antibodies, specifically IgG, are proportional to the dose of *PbVac* administered.

Therefore, the insertion of *PfCSP* in *P.berghei* is a fundamental component to reduce *P.falciparum* sporozoite invasion of liver cells, inducing antibody responses<sup>97</sup>. As a consequence of immunization, *PbVac* elicits also cellular immune responses, induced mainly by cross-species, *P.berghei/P.falciparum* in this case. In contrast, trial results show a small influence on cellular responses<sup>96</sup>. As data show, was observed a significant increase of lymphocytes producing IFN- $\gamma$  of *PbVac*-specific, but not *PfCSP*- specific. Also, after immunization, CD4+ and CD8+ T cells expressed any combination of INF- $\gamma$ , IL-2 and TNF- $\alpha$  with *PbVac*-specific but not with *PfCSP*. However, immunization it was verified in all cases, an increase of CD8+T,  $\gamma\delta$  T cells, and natural killer (NK) cells, and a decrease of monocytes, due to the displacement to the liver, where they may contribute to the development of immune responses<sup>96</sup>.

In conclusion, this phase I/IIa clinical trial of a genetically modified rodent malaria parasite for immunization against human infection by *P.falciparum*, primarily demonstrates that this vaccine is safe and well tolerated when administered to healthy humans. Although sterile protection was not demonstrated, the reduced parasite density demonstrated the protective efficacy of PbVac upon CHMI by mosquito bites. Immunization with PbVac, on the one hand, induces PfCSP-dependent antibody responses that efficiently inhibit *P. falciparum* sporozoites invasion of liver cells in vitro, on the other hand, induces dose-dependent cross-species cellular immune responses. Of note, the heterogeneity of individual immune responses results in the absence of correlation between humoral and cellular immune responses and a lack of individual predictability of clinical outcomes<sup>96</sup>.

## **5.2. Other candidate vaccine antigens using *Plasmodium* chimerical rodent parasites**

Despite CSP, several other antigens from different stages have shown cross-species protection against human *Plasmodium* parasites. Although the protective response of the most is not as good as desired, it is known that the inclusion of the adjuvants in the formulation and the simultaneous addition of several antigens can complement the responses<sup>98</sup>. Table I lists some of the potential antigens that have been investigated over the last decade for incorporation into the rodent sporozoite genome.

**Table 1:** Potential antigens used in *Plasmodium* chimeric rodent parasites and their respective reported protection.

Antigen	Stage life cycle target of parasite	Cellular location and main function	Protection reported	Ref.
<b><i>Plasmodium falciparum</i></b>				
<b>CSP</b>	Pre-erythrocytic stage	Sporozoite membrane surface. Involved in sporozoite motility and liver invasion.	Elicit cross-species Cellular responses and functional antibodies, inhibiting invasion of liver cells by <i>P.falciparum</i> .	96
<b>CeITOS</b>	Pre-erythrocytic stage	Localized to the parasite micronemes; Important in the cell transversal in both hosts.	Cross-species protection, eliciting potent cellular (IFN- $\gamma$ and IL-4) and humoral responses.	99
<b>LSA1/ LSAP2</b>	Pre-erythrocytic stage	Expressed only in infected hepatocytes, in the parasitophorous vacuole. They are involved in hepatic schizogony and merozoite development.	The combination of these antigens is the most effective. Capable of inducing sterile protection dependent on the presence of CD8 <sup>+</sup> T cells.	100
<b><i>Plasmodium vivax</i></b>				
<b>CSP</b>	Pre-erythrocytic stage	Sporozoite membrane surface. Involved in sporozoite motility and liver invasion.	Production of anti-PvCSP antibodies, recognize and bind to <i>P. yoelii</i> sporozoites.	101
<b>TRAP</b>	Pre-erythrocytic stage	Localized in membrane surface and in the micronemes. Mediates invasion in mosquito salivary glands and the vertebrate hepatocytes.	Induction of CD8 <sup>+</sup> T cells and antibodies, inhibiting sporozoite invasion of human hepatocytes.	102
<b>DBP</b>	Blood -stage	Micronemal location. Involved in the invasion of human erythrocytes.	Antibody responses, inhibiting <i>P.vivax</i> invasion of human RBC.	103
<b>Pvs25</b>	Transmission-blocking stage	Localized to the parasite micronemes. Necessary to the survival of ookinetes in the mosquito midgut.	Highly antibodies titers, Th1 and Th2 response against Pvs25, suppressing sexual stage of <i>P.vivax</i> .	104

**Legend:** **CSP** (Circumsporozoite surface protein); **CeITOS** (Cell-Transversal protein for ookinetes and sporozoites); **DBP** (Duffy binding protein); **LSA1** (liver-stage antigen 1); **LSAP2** (liver-stage associated 2); **MSP 1** (merozoite surface protein 1); **Pvs25** (*P. vivax* ookinete surface protein); **TRAP** (Thrombospondin-related Anonymous Protein).

## 6. Future perspectives of *P.berghei*-based on whole-sporozoite vaccination

The previous clinical trial reflected a promising approach to developing a vaccine design that protects against multiple species and different stages of the parasite 's life cycle.<sup>90</sup>

The first goal is to achieve 100% of sterile protection, and to that end, several ways are being explored. It is known that the efficacy and immune response of *PbVac* is dose-dependent and requires a high number of parasites<sup>96</sup>. For this reason, and for ethical reasons, it is not feasible to administer the vaccine through mosquito bites. The solution seems to point to its parenteral administration in defined doses, which is being developed by Sanaria<sup>68; 90</sup>.

Another target to improve is the immunogenic potential of the *P.berghei* platform. The insertion of other antigens on *P.berghei*, in addition to *PfCSP*, that contemplate the various



stages of the life cycle, such as *Pfs48/45* (gametocyte antigens) and *PfRh5*, under the control of a strict promoter of the pre-erythrocytic stage, is a mechanism based on heterologous (cross-species) immunity, improving strain-transcending immune response<sup>105; 106</sup>. Also, the insertion of multi-species antigens [*Pb*WT, *Pb*(*PfCSP*), *Pb*(*PvCSP210*), *Pb*(*PfCSP/PvCSP210*)], which is not done in other whole-sporozoite immunization approaches (RAS, GAP, CSP), is an attractive tool to obtain human malaria vaccines<sup>91; 107</sup>.

Furthermore, the rodent *Plasmodium* parasite can act as an immunization platform for infections caused by other's apicomplexan parasites, such as *Toxoplasma gondii*, which share 33% of the amino acid sequences of the inner membrane complex, and its exposure to the *P.berghei* confers resistance to infection caused by *T. gondii* (toxoplasmosis)<sup>108</sup>.

In conclusion, all these complementary strategies and their combination are being exploited to cover a complete sterile immunity vaccine and to optimize results in next-generation vaccines.

## 7. Final Remarks

Achieving immunity is the most feasible and effective way to control infectious diseases, and malaria is no exception. Several vaccines have been developed, and despite the approval of RTS, S, new vaccines are needed. Whole sporozoite vaccines appear promising, but further development is needed to overcome some of their barriers, such as maintaining a cold chain, mode of administration, attenuation of efficacy, and the production of parasite cultures<sup>52</sup>. Recently, the *P.berghei* - based approach has proven to be excellent for inducing selected antigens, leading to targeted and effective responses on a platform, but also has limitations in terms of efficacy and administration, which are currently being worked on. Nevertheless, it represents a significant achievement towards an effective malaria vaccine.

Malaria eradication requires an effort from all countries to strengthen economic, technological, and socio-political resources. Once immunity is achieved, the benefits and return on investment are obvious. Therefore, it is imperative to continue to focus on the research for an effective vaccine that can be implemented for the well-being and safety of global health.

## 8. References

1. PREVENTION, CDC-Centers For Disease Control And - CDC - Malaria - About Malaria - Biology. 2020).
2. ARROW, Kenneth J.; PANOSIAN, Claire; GELBAND, Hellen - **Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance** Disponível em : <http://www.nap.edu/catalog/11017.html>
3. CDC - Malaria - About Malaria - FAQs - 2017).
4. AGNANDJI, Selidji Todagbe *et al.* - CDC - Malaria - Malaria Worldwide - How Can Malaria Cases and Deaths Be Reduced? - Vaccines. **PLoS Medicine**. ISSN 15491676. 11:7 (2021).
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION - World Malaria Report. **World Health**. ISSN 08966273. WHO/HTM/GM:December (2010) 238. doi: ISBN 978 92 4 1564403.
6. BLOLAND, Peter B. *et al.* - **Malaria control during mass population movements and natural disasters**. [S.l.] : National Academies Press, 2003. ISBN 0309503620.
7. PHILLIPS, Margaret A. *et al.* - Malaria. **Nature Reviews Disease Primers**. ISSN 2056676X. 3:2017). doi: 10.1038/nrdp.2017.50.
8. PENNY, Melissa A. *et al.* - Public health impact and cost-effectiveness of the RTS,S/AS01 malaria vaccine: A systematic comparison of predictions from four mathematical models. **The Lancet**. ISSN 1474547X. 387:10016 (2016) 367–375. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00725-4.
9. WHO - Immunization agenda 2030. 2021) 1–24.
10. NUNES-CABAÇO, Helena; MOITA, Diana; PRUDÊNCIO, Miguel - Five decades of clinical assessment of whole-sporozoite malaria vaccines. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 13:2022) 1–29. doi: 10.3389/fimmu.2022.977472.
11. WHO - Malaria WHO. **World Health Organization**. ISSN 2212-8271. 2020) 1.
12. MORRISSETTE, Naomi S.; SIBLEY, L. David - Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. ISSN 1092-2172. 66:1 (2002) 21–38. doi: 10.1128/mubr.66.1.21-38.2002.
13. AMINO, Rogerio *et al.* - Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. **Comptes Rendus - Biologies**. ISSN 16310691. 329:11 (2006) 858–862. doi: 10.1016/j.crv.2006.04.003.

14. DINI, Saber *et al.* - The risk of morbidity and mortality following recurrent malaria in Papua, Indonesia: A retrospective cohort study. **BMC Medicine**. ISSN 17417015. 18:1 (2020) 1–12. doi: 10.1186/s12916-020-1497-0.
15. TSUBOI, Takafumi; PORTILLO, Hernando A. DEL; MUELLER, Ivo - Editorial on the special issue on *Plasmodium vivax*: Current situation and challenges towards elimination. **Parasitology International**. ISSN 18730329. 89:2022) 4–6. doi: 10.1016/j.parint.2022.102594.
16. ANGRISANO, Fiona; ROBINSON, Leanne J. - *Plasmodium vivax* – How hidden reservoirs hinder global malaria elimination. **Parasitology International**. ISSN 18730329. 87:2022) 102526. doi: 10.1016/j.parint.2021.102526.
17. CDC - CDC - DPDx - Malaria. **CDC Centers for Disease Control and Prevention**. ISSN 20100221. 2017) 1–3.
18. GRIFFITHS, R. B.; GORDON, R. M. - An apparatus which enables the process of feeding by mosquitoes to be observed in the tissues of a live rodent; together with an account of the ejection of saliva and its significance in malaria. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. ISSN 13648594. 46:4 (1952) 311–319. doi: 10.1080/00034983.1952.11685536.
19. VAUGHAN, Ashley M.; KAPPE, Stefan H. I. - and Exoerythrocytic Biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2017) 1–22.
20. TAVARES, Joana *et al.* - Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **Journal of Experimental Medicine**. ISSN 00221007. 210:5 (2013) 905–915. doi: 10.1084/jem.20121130.
21. ARIAS, Irwin M. *et al.* - the Liver in *Plasmodium* Life Style. 2020).
22. SOULARD, Valérie *et al.* - *Plasmodium falciparum* full life cycle and *Plasmodium ovale* liver stages in humanized mice. **Nature Communications**. ISSN 20411723. 6:May (2015). doi: 10.1038/ncomms8690.
23. VLACHOU, Dina *et al.* - The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. **Current Opinion in Genetics and Development**. ISSN 0959437X. 16:4 (2006) 384–391. doi: 10.1016/j.gde.2006.06.012.
24. PLEWES, Katherine *et al.* - Malaria: What's New in the Management of Malaria? **Infectious Disease Clinics of North America**. ISSN 15579824. 33:1 (2019) 39–60. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.002.

25. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC - Malaria - Malaria Worldwide - How Can Malaria Cases and Deaths Be Reduced? 2018).
26. LOBO, Neil F. *et al.* - Modern vector control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. ISSN 21571422. 8:1 (2018) 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a025643.
27. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO Guidelines for malaria - June 2022. **Who**. 2022) 1–396.
28. RUSSELL, Tanya L. *et al.* - Capacity of National Malaria Control Programmes to implement vector surveillance: a global analysis. **Malaria Journal**. ISSN 14752875. 19:1 (2020) 1–9. doi: 10.1186/s12936-020-03493-1.
29. HEALER, Julie *et al.* - Vaccines to Accelerate Malaria Elimination and Eventual Eradication. 2019) 1–18.
30. MAC-DANIEL, Laura; MÉNARD, Robert - Live vaccines against plasmodium preerythrocytic stages. Em **Methods in Molecular Biology**. [S.l.] : Humana Press Inc., 2019v. 2013. p. 189-1981. MAC-DANIEL, Laura; MÉNARD, Robert-Live.
31. OUATTARA, Amed *et al.* - Designing malaria vaccines to circumvent antigen variability. **Vaccine**. ISSN 18732518. 33:52 (2015) 7506–7512. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.110.
32. WILSON, K. L. *et al.* - Malaria vaccines in the eradication era: current status and future perspectives. **Expert Review of Vaccines**. ISSN 17448395. 18:2 (2019) 133–151. doi: 10.1080/14760584.2019.1561289.
33. Towards Malaria Elimination - A Leap Forward - **Towards Malaria Elimination - A Leap Forward**. 2018). doi: 10.5772/intechopen.69750.
34. ASSESSMENT, Technology - Vaccine development: Capabilities and challenges for addressing infectious diseases. **COVID-19 Vaccines: Development, Distribution and Mandates**. November (2022) 1–63.
35. LAURENS, Matthew B. - The Promise of a Malaria Vaccine - Are We Closer? **Annual Review of Microbiology**. ISSN 15453251. 72:2018) 273–292. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062427.
36. K. BAER - Malaria parasite life cycle | PATH's Malaria Vaccine Initiative. **Malaria Vaccine Initiative**. 2021).
37. FRIMPONG, Augustina *et al.* - Novel strategies for malaria vaccine design. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 9:NOV (2018). doi: 10.3389/fimmu.2018.02769.

38. FLANAGAN, Katie L. *et al.* - Broadly distributed T cell reactivity, with no immunodominant loci, to the pre-erythrocytic antigen thrombospondin-related adhesive protein of *Plasmodium falciparum* in West Africans. **European Journal of Immunology**. ISSN 00142980. 29:6 (1999) 1943–1954. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<1943::AID-IMMU1943>3.0.CO;2-I.
39. FLANAGAN, Katie L.; WILSON, Kirsty L.; PLEBANSKI, Magdalena - Polymorphism in liver-stage malaria vaccine candidate proteins: Immune evasion and implications for vaccine design. **Expert Review of Vaccines**. ISSN 17448395. 15:3 (2016) 389–399. doi: 10.1586/14760584.2016.1125785.
40. KING, Anthony - First malaria vaccine approved as hopes are raised for new, better ones. **Chemistry World**. ISSN 14737604. 18:11 (2021) 8.
41. MILLER, Louis H. *et al.* - Malaria biology and disease pathogenesis: Insights for new treatments. **Nature Medicine**. ISSN 10788956. 19:2 (2013) 156–167. doi: 10.1038/nm.3073.
42. VIJAYAN, Aneesh; CHITNIS, Chetan E. - Development of blood stage malaria vaccines. **Methods in Molecular Biology**. ISSN 19406029. 2013:2019) 199–218. doi: 10.1007/978-1-4939-9550-9\_15.
43. REMARQUE, Edmond J. *et al.* - Accelerated phase Ia/b evaluation of the malaria vaccine candidate PfAMA1 DiCo demonstrates broadening of humoral immune responses. **npj Vaccines**. ISSN 20590105. 6:1 (2021). doi: 10.1038/s41541-021-00319-2.
44. DOUMBO, Ogobara K. *et al.* - Malaria Transmission-Blocking Vaccines: Present Status and Future Perspectives. **Towards Malaria Elimination - A Leap Forward**. 2018). doi: 10.5772/intechopen.77241.
45. LAURENS, Matthew B. - The Promise of a Malaria Vaccine - Are We Closer? **Annual Review of Microbiology**. ISSN 15453251. 72:2018) 273–292. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062427.
46. SAGARA, Issaka *et al.* - Safety and immunogenicity of Pfs25H-EPA/Alhydrogel, a transmission-blocking vaccine against *Plasmodium falciparum*: a randomised, double-blind, comparator-controlled, dose-escalation study in healthy Malian adults. **The Lancet Infectious Diseases**. ISSN 14744457. 18:9 (2018) 969–982. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30344-X.

47. SINGH, Susheel K. *et al.* - Preclinical development of a Pfs230-Pfs48/45 chimeric malaria transmission-blocking vaccine. **npj Vaccines**. ISSN 20590105. 6:1 (2021) 1–11. doi: 10.1038/s41541-021-00383-8.
48. SHERRARD-SMITH, Ellie *et al.* - Synergy in anti-malarial pre-erythrocytic and transmission-blocking antibodies is achieved by reducing parasite density. **eLife**. ISSN 2050084X. 7:2018) 1–15. doi: 10.7554/eLife.35213.
49. DRUILHE, Pierre; BARNWELL, John W. - Pre-erythrocytic stage malaria vaccines: time for a change in path. **Current Opinion in Microbiology**. ISSN 13695274. 10:4 (2007) 371–378. doi: 10.1016/j.mib.2007.07.009.
50. ZUZARTE-LUIS, Vanessa; MOTA, Maria M.; VIGÁRIO, Ana M. - Malaria infections: What and how can mice teach us. **Journal of Immunological Methods**. ISSN 18727905. 410:2014) 113–122. doi: 10.1016/j.jim.2014.05.001.
51. LONG, Carole A.; ZAVALA, Fidel - Malaria vaccines and human immune responses. **Current Opinion in Microbiology**. ISSN 18790364. 32:2016) 96–102. doi: 10.1016/j.mib.2016.04.006.
52. MARQUES-DA-SILVA, Camila; PEISSIG, Kristen; KURUP, Samarchith P. - Pre-erythrocytic vaccines against malaria. **Vaccines**. ISSN 2076393X. 8:3 (2020) 1–16. doi: 10.3390/vaccines8030400.
53. HERRINGTON, Deirdre A. *et al.* - Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against plasmodium falciparum sporozoites. **Nature**. ISSN 00280836. 328:6127 (1988) 257–259. doi: 10.1038/328257a0.
54. DIDIERLAURENT, Arnaud M. *et al.* - Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. **Expert Review of Vaccines**. ISSN 17448395. 16:1 (2017) 55–63. doi: 10.1080/14760584.2016.1213632.
55. SKWARCZYNSKI, Mariusz; TOTH, Istvan - Peptide-based synthetic vaccines. **Chemical Science**. ISSN 20416539. 7:2 (2016) 842–854. doi: 10.1039/c5sc03892h.
56. VARTAK, Abhishek; SUCHECK, Steven J. - Recent advances in subunit vaccine carriers. **Vaccines**. ISSN 2076393X. 4:2 (2016) 1–18. doi: 10.3390/vaccines4020012.
57. FLANAGAN, Katie L. *et al.* - Broadly distributed T cell reactivity, with no immunodominant loci, to the pre-erythrocytic antigen thrombospondin-related adhesive protein of Plasmodium falciparum in West Africans. **European Journal of Immunology**.

ISSN 00142980. 29:6 (1999) 1943–1954. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<1943::AID-IMMU1943>3.0.CO;2-I.

58. SCARIA, Puthupparampil V. *et al.* - Protein-protein conjugate nanoparticles for malaria antigen delivery and enhanced immunogenicity. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 12:12 (2017) 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0190312.

59. LIMA, Karla M. *et al.* - Vaccine adjuvant: It makes the difference. Em **Vaccine**

60. HILL, Adrian V. S. - Pre-erythrocytic malaria vaccines: Towards greater efficacy. **Nature Reviews Immunology**. ISSN 14741733. 6:1 (2006) 21–32. doi: 10.1038/nri1746.

61. PRAET, Nicolas *et al.* - Assessing the safety, impact and effectiveness of RTS,S/AS01E malaria vaccine following its introduction in three sub-Saharan African countries: methodological approaches and study set-up. **Malaria Journal**. ISSN 14752875. 21:1 (2022) 1–12. doi: 10.1186/s12936-022-04144-3.

62. VENKATESAN, Priya - The future of malaria control in light of RTS,S. **The Lancet Microbe**. ISSN 26665247. 3:4 (2022) e251. doi: 10.1016/s2666-5247(22)00070-2.

63. MALARIA VACCINE FUNDERS GROUP - Malaria Vaccine Funders Group. Malaria Vaccine Technology roadmap 2013. **The Lancet**. November (2013).

64. CLYDE, D. F. *et al.* - Immunization of man against sporozoite induced falciparum malaria. **American Journal of the Medical Sciences**. ISSN 00029629. 266:3 (1973) 169–177. doi: 10.1097/00000441-197309000-00002.

65. MAC-DANIEL, Laura; MÉNARD, Robert - Live vaccines against plasmodium preerythrocytic stages. Em **Methods in Molecular Biology**. [S.l.] : Humana Press Inc., 2019v. 2013. p. 189–198.

66. SPRING, Michele; POLHEMUS, Mark; OCKENHOUSE, Christian - Controlled human malaria infection. **Journal of Infectious Diseases**. ISSN 15376613. 209:SUPPL. 2 (2014). doi: 10.1093/infdis/jiu063.

67. GÓMEZ-PÉREZ, Gloria P. *et al.* - Controlled human malaria infection by intramuscular and direct venous inoculation of cryopreserved Plasmodium falciparum sporozoites in malaria-naïve volunteers: effect of injection volume and dose on infectivity rates. **Malaria Journal**. ISSN 14752875. 14:1 (2015) 1–13. doi: 10.1186/s12936-015-0817-x.

68. NUSSENZWEIG, R. S. *et al.* - Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. **Nature**. ISSN 00280836. 216:5111 (1967) 160–162. doi: 10.1038/216160a0.

69. MOTA, Maria M.; RODRIGUEZ, Ana - **Maria M. Mota · Ana Rodriguez**. ISBN 9783319452081.
70. JAMES, Eric R. *et al.* - A First for Human Vaccinology: GMP Compliant Radiation Attenuation of Plasmodium falciparum Sporozoites for Production of a Vaccine Against Malaria. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 13:2022). doi: 10.3389/fimmu.2022.851028.
71. WINKEL, Béatrice M. F. *et al.* - Quantification of wild-type and radiation attenuated Plasmodium falciparum sporozoite motility in human skin. **Scientific Reports**. ISSN 20452322. 9:1 (2019). doi: 10.1038/s41598-019-49895-3.
72. LYKE, Kirsten E. *et al.* - Attenuated PfSPZ Vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 10916490. 114:10 (2017) 2711–2716. doi: 10.1073/pnas.1615324114.
73. GARCIA, Cristina Reyes *et al.* - Comparative cost models of a liquid nitrogen vapor phase (LNVP) cold chain-distributed cryopreserved malaria vaccine vs. a conventional vaccine. **Vaccine**. ISSN 0264410X. 31:2 (2013) 380–386. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.109.
74. KAISER, Karine *et al.* - Differential transcriptome profiling identifies Plasmodium genes encoding pre-erythrocytic stage-specific proteins. **Molecular Microbiology**. ISSN 0950382X. 51:5 (2004) 1221–1232. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03909.x.
75. KAPPE, Stefan H. I. *et al.* - That was then but this is now: Malaria research in the time of an eradication agenda. **Science**. ISSN 00368075. 328:5980 (2010) 862–866. doi: 10.1126/science.1184785.
76. SCHAIJK, Ben C. L. VAN *et al.* - A genetically attenuated malaria vaccine candidate based on P. falciparum b9/slarp gene-deficient sporozoites. **eLife**. ISSN 2050084X. 3: November (2014) 1–18. doi: 10.7554/eLife.03582.
77. FRANKE-FAYARD, Blandine *et al.* - Creation and preclinical evaluation of genetically attenuated malaria parasites arresting growth late in the liver. **npj Vaccines**. ISSN 20590105. 7:1 (2022). doi: 10.1038/s41541-022-00558-x.
78. BIJKER, Else M. *et al.* - Novel approaches to whole sporozoite vaccination against malaria. **Vaccine**. ISSN 18732518. 33:52 (2015) 7462–7468. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.095.



79. RICHIE, Thomas L. *et al.* - Progress with Plasmodium falciparum sporozoite (PfSPZ)-based malaria vaccines. **Vaccine**. ISSN 18732518. 33:52 (2015) 7452–7461. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.096.
80. ROESTENBERG, Meta *et al.* - **Protection against a Malaria Challenge by Sporozoite Inoculation From the Departments of Medical Micro-biology (M A b s t r a c t**
81. CHATTOPADHYAY, Rana; PRATT, Douglas - Role of controlled human malaria infection (CHMI) in malaria vaccine development: A U.S. food & drug administration (FDA) perspective. **Vaccine**. ISSN 18732518. 35:21 (2017) 2767–2769. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.03.072.
82. DOLL, Katherine L.; HARTY, John T. - Correlates of protective immunity following whole sporozoite vaccination against malaria. **Immunologic Research**. ISSN 15590755. 59:1–3 (2014) 166–176. doi: 10.1007/s12026-014-8525-0.
83. PARMAR, Rajesh; PATEL, Hardik; DALAI, Sarat - Whole Sporozoite Vaccination: Duration between Successive Immunization Dictates the Fate Of Protective Immunity. **Journal of Pediatrics and Pediatric Medicine**. 3:3 (2019) 1–6. doi: 10.29245/2578-2940/2019/3.1148.
84. RICHIE, Thomas *et al.* - Progress with P. falciparum sporozoite based malaria vaccines. **Vaccine**. 33:52 (2015) 7452–7461. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.096.Progress.
85. HOFFMAN, Stephen L. *et al.* - The March Toward Malaria Vaccines. **American Journal of Preventive Medicine**. ISSN 18732607. 49:6 (2015) S319–S333. doi: 10.1016/j.amepre.2015.09.011.
86. RIEDEL, Stefan - Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. **Baylor University Medical Center Proceedings**. ISSN 0899-8280. 18:1 (2005) 21–25. doi: 10.1080/08998280.2005.11928028.
87. PLOTKIN, Stanley - History of vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 10916490. 111:34 (2014) 12283–12287. doi: 10.1073/pnas.1400472111.
88. MENDES, António M. *et al.* - Pre-clinical evaluation of a P. berghei-based whole-sporozoite malaria vaccine candidate. **npj Vaccines**. ISSN 20590105. 3:1 (2018). doi: 10.1038/s41541-018-0091-3.

89. TRAUB, W.; YONATH, A. - © 1969 Nature Publishing Group. **Group**. ISSN 0028-0836. 224:1969) 177–178.
90. MENDES, António M. *et al.* - A Plasmodium berghei sporozoite-based vaccination platform against human malaria. **npj Vaccines**. ISSN 20590105. 3:1 (2018). doi: 10.1038/s41541-018-0068-2.
91. CALDELARI, Reto *et al.* - Transcriptome analysis of Plasmodium berghei during exo-erythrocytic development. **Malaria Journal**. ISSN 14752875. 18:1 (2019). doi: 10.1186/s12936-019-2968-7.
92. LIN, Jing Wen *et al.* - A novel «Gene Insertion/Marker Out» (GIMO) method for transgene expression and gene complementation in rodent malaria parasites. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 6:12 (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0029289.
93. ESPINOSA, Diego A.; RADTKE, Andrea J.; ZAVALA, Fidel - Development and assessment of transgenic rodent parasites for the preclinical evaluation of malaria vaccines. **Methods in Molecular Biology**. ISSN 10643745. 1403:3 (2016) 583–601. doi: 10.1007/978-1-4939-3387-7\_33.
94. MUELLER, Ann-Kristin *et al.* - **Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface**
95. MENDES, António M. *et al.* - Supporting Information for A Plasmodium berghei Sporozoite-Based Vaccination Platform Against Human Malaria. 119: [s.d.] 1–20.
96. REULING, Isaie J. *et al.* - An open-label phase I/2a trial of a genetically modified rodent malaria parasite for immunization against Plasmodium falciparum malaria. **Science Translational Medicine**. ISSN 19466242. 12:544 (2020). doi: 10.1126/scitranslmed.aay2578.
97. MITRAN, Catherine J.; YANOW, Stephanie K. - The Case for Exploiting Cross-Species Epitopes in Malaria Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 11:2020). doi: 10.3389/fimmu.2020.00335.
98. KOLLI, Surendra Kumar *et al.* - Screening of viral-vectored P. falciparum pre-erythrocytic candidate vaccine antigens using chimeric rodent parasites. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 16:7 July (2021) 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0254498.
99. BERGMANN-LEITNER, Elke S. *et al.* - Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from plasmodium falciparum elicits cross-species protection against heterologous challenge with Plasmodium berghei. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 5:8 (2010). doi: 10.1371/journal.pone.0012294.

100. HALBROTH, Benedict R. *et al.* - Preclinical development and assessment of viral vectors expressing a fusion antigen of plasmodium falciparum LSA1 and LSAP2 for efficacy against liver-stage malaria. **Infection and Immunity**. ISSN 10985522. 88:2 (2020). doi: 10.1128/IAI.00573-19.
101. MOITA, Diana *et al.* - A genetically modified Plasmodium berghei parasite as a surrogate for whole-sporozoite vaccination against P. vivax malaria. **npj Vaccines**. ISSN 20590105. 7:1 (2022). doi: 10.1038/s41541-022-00585-8.
102. BAUZA, Karolis *et al.* - Efficacy of a Plasmodium vivax malaria vaccine using ChAd63 and modified vaccinia ankara expressing thrombospondin-related anonymous protein as assessed with transgenic Plasmodium berghei parasites. **Infection and Immunity**. ISSN 00199567. 82:3 (2014) 1277–1286. doi: 10.1128/IAI.01187-13.
103. RAWLINSON, Thomas A. *et al.* - Structural basis for inhibition of Plasmodium vivax invasion by a broadly neutralizing vaccine-induced human antibody. **Nature Microbiology**. ISSN 20585276. 4:9 (2019) 1497–1507. doi: 10.1038/s41564-019-0462-1.
104. BLAGBOROUGH, Andrew M. *et al.* - Intranasal and intramuscular immunization with Baculovirus Dual Expression System-based Pvs25 vaccine substantially blocks Plasmodium vivax transmission. **Vaccine**. ISSN 0264410X. 28:37 (2010) 6014–6020. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.100.
105. CAO, Yi *et al.* - Immunological cross-reactivity between malaria vaccine target antigen P48/45 in plasmodium vivax and P. falciparum and cross-boosting of immune responses. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 11:7 (2016) 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0158212.
106. DOUGLAS, Alexander D. *et al.* - A PfRH5-based vaccine is efficacious against heterologous strain blood-stage plasmodium falciparum infection in Aotus monkeys. **Cell Host and Microbe**. ISSN 19346069. 17:1 (2015) 130–139. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.017.
107. SALMAN, Ahmed M. *et al.* - Generation of transgenic rodent malaria parasites expressing human malaria parasite proteins. In **Methods in Molecular Biology**. [S.l.]: Humana Press Inc., 2015v. 1325. p. 257–286.
108. LEE, Dong Hun *et al.* - Previous infection with plasmodium berghei confers resistance to toxoplasma gondii infection in mice. **Korean Journal of Parasitology**. ISSN 17380006. 57:2 (2019) 93–99. doi: 10.3347/kjp.2019.57.2.93.