

Generalità

La malaria è una malattia causata da protozoi parassiti appartenenti al genere *Plasmodium* il cui ciclo biologico si svolge in due ospiti obbligati, un vertebrato, come ospite intermedio e una femmina di zanzara come ospite definitivo, detto anche vettore. Le specie di plasmodi responsabili della malaria umana si trasmettono in modo naturale da uomo a uomo mediante la puntura di zanzare infette appartenenti al genere **Anopheles Gambiae, Anopheles stephensi e Aedes aegypti**.

Tuttavia si può verificare trasmissione anche con eventi accidentali mediante contagio ematico diretto.

I Plasmodi umani

Le specie di plasmodi responsabili della malaria umana sono:

- ***Plasmodium falciparum***, agente della cosiddetta terzana maligna (ciclo di replicazione del parassita nel sangue umano, ciclo schizogonico, ogni 48 ore), endemico in Africa sub-Sahariana, Asia e America Latina, Papua-Nuova Guinea e in alcune isole del Pacifico orientale
- ***P. vivax***, agente della terzana benigna, prevalente in zone a clima temperato, oltre che in Africa orientale, Asia e America Latina
- ***P. ovale***, con le due sottospecie *P. ovale curtisi* e *P. ovale wallikeri*, agenti di forme di terzana benigna, molto comuni principalmente in Africa occidentale, raramente nel Pacifico
- ***P. malariae***, responsabile della quartana benigna (ciclo schizogonico ematico ogni 72 ore), diffuso in aree tropicali e sub-tropicali in modo non uniforme e comunque sempre con una frequenza piuttosto bassa-
- ***P. knowlesi***, morfologicamente simile a *P. malariae*, presente in varie aree del Sud-est asiatico e responsabile della malaria di alcune scimmie arboricole di foresta. A causa dei numerosi focolai umani identificati inizialmente in Borneo e poi in molte altre regioni del Sud-est asiatico, dal 2008 *P. knowlesi* viene considerato a tutti gli effetti la quinta specie di plasmodio responsabile di malaria nell'uomo.

Ciclo vitale del PLASMODIO MALARICO nell'Uomo

- La zanzara, la quale ha all'interno delle ghiandole salivari gli sporozoit, è l'inizio del ciclo della MALARIA. Durante il pasto, la zanzara femmina, deve mettere in atto un sistema funzionale, che le permetta di mettere un pasto il più abbondante possibile. Il tutto è permesso grazie alle ghiandole salivari, le quali possiedono delle sostanze anticoagulanti, vasodilatatrici ed anestetiche. Se la zanzara, è affetta da malaria, durante tale pasto, trasmetterà gli SPOROZOITI.
- L'inoculo avviene all'interno del capillare, nel caso in cui, la zanzara non trovi subito il capillare, gli SPOROZOITI, nel momento in cui arrivano nell'AMBIENTE di 37° aumentano la loro attività e raggiungono il torrente ematico.
 - o Se l'inoculazione avviene direttamente nel capillare, gli SPOROZOITI aumentano la loro attività vitale, ovvero proliferano in uno stadio, che non è facilmente riconoscibile dal sistema immunitario di un soggetto immunocompetente, e lo può fare in modo più latente e veloce possibile.
- La malaria arriva al fegato per mezzo del circolo portale, aderisce all'endotelio dei vasi che irrorano il fegato, lo attraversa ed arriva a livello degli epatociti, all'intero dei quali avviene la fase SCHIZONTICA, il parassita si riproduce per scissione binaria, facendo sì che la popolazione aumenti di numero senza nessuna ricombinazione genetica.
 - o Il parassita che esce dell'EPATOCITA, viene definito SCHIZONTE.
 - o Quando il parassita, colonizza completamente l'epatocita, la lisa completamente, cambia la sede, ed inizia un'altra parte del suo ciclo vitale.
- Uscito dagli EPATOCITI, ritrova i capillari, ed entra nel torrente circolatorio, dove cerca i GLOBULI ROSSI, vi aderisci, orienta il CONIDE, forza con una giunzione mobile la membrana del globulo rosso, e lo induce ad avvolgerlo, all'interno del VACUOLO PARASSITOFILO.
 - o Il parassita diventa così un TROFOZOITE, ovvero una CELLULA che si alimenta in modo ATTIVO, ed EFFICIENTE dell'EMOGLOBINA che è contenuta in abbondanza all'interno dell'ERITROCITA, effettuando una RIMANIPOLAZIONE del NUCLEO, dove produce tanti nuclei ed organi apicali a spese dell'EMOGLOBINA e dopo aver prodotto un numero elevato di potenziali TRFOZOITI, lisa il globulo rosso, riversandosi nuovamente nel torrente ematico, e ricominciando il ciclo.
 - Tale ciclo risulta essere SINCRONO, ovvero tutti gli SCHIZONTI che escono dall'EPATOCITA, in maniera SINCRONA invadono i globuli rossi. La cadenza temporale del parassitismo, è correlato alla specie del PLASMODIO MALARICO.

- L'interesse principale del parassita, non è quello di uccidere il soggetto, ma quello di arrivare ad una concentrazione nel sangue, di forme potenzialmente infettive e protrarre tale condizione per un arco temporale il più lungo possibile.
 - Arrivato al numero di parassiti idoneo per la sopravvivenza, vi è l'innesco da parte di un meccanismo di segnalazione per la produzione dei gameti. Se osserviamo all'interno di un eritrocita riscontriamo i GAMETOCITI, ovvero cellule che rappresentano i gameti immaturi, non un dimorfismo tra gamete femminile e maschile, ma un macrogamete sferoidale che occupa tutto il citoplasma dell'eritrocita, il quale rappresenta il precursore del gamete maschile.
 - Si forma il PIGMENTO MALARICO, ovvero risultante dalla chelazione del ferro.
- Quando una zanzara ematofaga malariogena effettua un pasto di sangue su un soggetto malarico che ha una malaria sufficientemente avanzata per aver già differenziato i gametociti, non avrà una selettività nel pasto di sangue ma avrà semplicemente 3 tipologie di eritrociti:
- Eritrociti colonizzati con plasmodi malarici.
 - Eritrociti con la fase Schizogonica.
 - Eritrociti con Gametociti all'interno.

Riscontriamo 3 fasi nel ciclo della malaria:

1. Fase Pre-Eritrocitaria o Esoeritrocitaria: fase insidiosa. Non da nessun segno clinico, di avere una malaria negli stadi iniziali.
2. Fase Schizogonica o endotrocitaria: si osserva l'inizio di una risposta anticorpale.
3. Fase sporogonica: vi è la creazione dei gameti.

Isoforme dei parassiti durante il ciclo

MEROZOITE: presenta tutti gli organuli di un Aplicomplexa. È una cellula specializzata nella ricerca e penetrazione all'interno di un TARGET. Possiedono un ruolo chiave all'interno del ciclo, ovvero ADESIONE e RIFORNIMENTO. Fanno in modo che l'eritrocita formi una membrana propria, si formano due punti di contatto in modo tale che il parassita possa penetrare al suo interno, ritrovandosi all'interno di una membrana SELF della cellula, ovvero il vacuolo parassitoforo. Quando il merozoite è rinchiuso all'interno del vacuolo parassitoforo si ha lo **stadio ad anello**, la cellula inizia a perdere la sua forma allungata e diventa SFEROIDALE, dove l'anello è formato da NUCLEO, MITOCONDRI e PLASTIDI. Successivamente inizia la vera fase di proliferazione.

- **Molecole effettrici per l'invasione del globulo rosso:** alcune di esse risultano essere già catalogate, altre invece, risultano essere ancora sconosciute. Questa fase risulta essere molto studiata, in quanto, se si riesce ad interferire, avremmo dei pazienti che dopo la fase pre-eritrocitaria non evolvono in fase di malaria cronica, questo perché la malaria non evolve in fase endoeritrocitaria.

- **Specie di plasmodium differenti, possiedono molecole di superficie differenti dalle loro specie congeneriche. Tale aspetto, potrebbe spiegare come mai, prendendo specie di PLASMODI MALARIOGENI, troviamo un decorso post-infezione ed una capacità di risposta diversa a seconda degli ospiti.**
 - **Plasmodium Malariae replica in 2 giorni.**
 - **Plasmodium Falciparum replica in 3 giorni.**

STADIO AD ANELLO: si osserva un CITOSTOMA, intorno a tale zona specializzata della membrana, che è quella che serve per internalizzare L'EMOGLOBINA a spese del globulo rosso, troviamo tanti VACUOLI di PIGMENTO MALARICO che cominciano a formarsi. Tale è un segnale che la cellula si sta evolvendo verso il cosiddetto TROFOZOITE.

TROFOZOITE: il citoplasma cresce, il nucleo diventa più sferico ed il Golgi è molto attivo, il mitocondrio è separato dal plastidio. Vi sono una serie di vescicole esocitate, ovvero i cataboliti che vengono espulsi nel citoplasma dell'Eritrocita. Tale stadio, sta facendo il suo ruolo di demolizione progressiva dell'EMOGLOBINA e TRASFORMAZIONE di proteine complesse per la formazione di NUOVI SCHIZONTI.

SCHIZONTE: quando il ciclo del trofozoite, risulta essere avanzato, osserviamo che il globulo rosso non ha quasi più citoplasma e viene occupato da tutta la fase finale della SCHIZOGONIA. Vi è un'elevato numero di MITOSI. Quando tutto si troverà nella posizione corretta, ogni SCHIZONTE romperà il ponte citoplasmatico, verrà la lisi del globulo rosso, riscontrando nel circolo:

- **Residui di membrana.**
- **Tracce di emoglobina.**
- **Schizonti.**
- **Pigmento malarico (Ferro con gruppo eme chelato in forme cristalline irreversibili).**

Ciclo vitale del PLASMODIO MALARICO nella zanzara

- La zanzara ingurgita il pasto di sangue, al suo interno vi saranno varie tipologie di globuli rossi, i quali vengono digeriti dalla zanzara, ad esclusione di quelli che al loro interno presentano dei MICROGAMETI, i quali presentano degli antigeni di superficie specifici e non vengono digeriti.

- I microgameti maschili si differenziano in strutture filiformi, funzionalmente analoghi ad uno spermatozoo.
- Le strutture filiformi, sono in grado di spostarsi ed andare a ricercare il MACROGAMETE FEMMINILE. Avviene la fecondazione dove i due patrimoni genetici APLOIDI si uniscono e divengono DIPLOIDI. La cellula cambia la sua conformazione, prende una forma allungata, si presentano i MICROTUBULI, evolve il CONOIDE assumendo la tipica forma di un APICOMPLEXA, la cellula prende il nome di OOCINETE.
- L'OOCINETE per mezzo del GLIDING, riconosce la membrana PERITROFICA, la attraversa e va alla ricerca degli ENTEROCITI della zanzara, dove si annida al di sotto della MEMBRANA BASALE, generando così gli OOCISTI.
- Il primo stadio che si presenta all'interno dell'OOCISTI è la MEIOSI (stadio diploide molto breve, in quanto, l'unico stadio DIPLOIDE va dall'incontro dei gameti al differenziazione delle OOCISTI).
- La massa delle OOCISTI accresce, ai danni delle materie nutritizie che si trovano dentro l'emolinfa. La differenziazione finale sono forme di SPOROZOITI, i quali a ciclo completata, sciamano nell'EMOLINFA.
- Una volta che gli sporozoit sono maturi, ed escono dall'OOCISTE, seguono una segnalazione proveniente dalle GHIANDOLE SALIVARI, penetrando all'interno delle ghiandole salivari, in quanto riconoscono la parete esterna. All'interno di tali ghiandole rimangono in stato quiescente fino al pasto successivo della zanzara.

__ Scala temporale di penetrazione __

Dopo circa 24H dal pasto, l'OOCINETE è competente per svolgere le sue funzioni:

- Entrare nell'epitelio da mesointestino.
- Produrre oocisti.
- Inizio della mitosi dopo aver fatto una MEIOSI.
- Formazione dello SPOROBLASTO.
- Rilascio degli SPOROZOITI dall'OOCISTI per far sì che questi possano colonizzare successivamente il lume delle ghiandole salivari.

Per l'esecuzione di tutto il ciclo, sono richieste circa 2 settimane.

__ Utilizzo della metodica LAMP per l'identificazione del parassita __

E' una metodica sensibile e rapida per l'identificazione della malaria, consiste in una procedura enzimatica isotermica, ovvero alla stessa temperatura, permette un risposta in circa 40'.

La metodica ricerca la subunità 18S dei ribosomi, presenti in tutte le tipologie di malaria, permettendo l'identificazione di una parassitemia molto bassa.

Legge l'intensità di amplificazione della sequenza che è stata disegnata la quale possiede un determinato cut-off per identificare positivo o negativo.

Possiede come VANTAGGI:

- Valido test di diagnosi in urgenza, non è necessaria una SPECIFICA ed ELEVATA formazione del personale.
- La sensibilità della metodica, risulta essere superiore alla MICROSCOPIA o RDT, ma la specificità è sub ottimale.
- Possiede un'importante valore predittivo, fondamentale per escludere la presenza del parassita in pazienti con sospetto infondato, senza dover effettuare strisci di sangue, che prevedono la presenza di personale esperto.

Possiede come SVANTAGGI:

- Valutazione nel FOLLOW-UP dei pazienti dopo terapia, in quanto il test rimane positivo a lungo, NON fornisce risultati QUANTITATIVI, ma solo la presenza o assenza del parassita.

Il protocollo diagnostico, nel caso in cui si effettui una ricerca mediante metodica LAMP, risulta essere il seguente:

- Risultato NEGATIVO: lo si referta come NEGATIVO.
- Risultato POSITIVO:
 - o GOCCIA SPESSA e STRISCIO SOTTILE:
 - Microscopia NEGATIVA: refertare come negativo.
 - Microscopia POSITIVA: refertare come POSITIVO identificando SPECIE e PARASSITEMIA.

___ Profilassi della Malaria ___

Il sistema di profilassi è multifattoriale.

In un trattamento con insetticidi mirato, secondo 3 parametri: quando, dove e quanto.

Innanzitutto si vanno a monitorare umidità e temperatura e poi vado ad osservare sul campo.

Quando → se cominciano a comparire.

Dove → nei luoghi dove le zanzare si riproducono quindi zone ombreggiate dove queste si possono rifugiare di giorno e zone con accumuli d'acqua.

Quanto → dobbiamo essere sicuri che le zanzare che vogliamo aggredire siano sensibili ai prodotti chimici che si devono impiegare.

Nota bene: ci sono diversi ceppi di zanzare che sono diventate resistenti. Hanno evoluto una capacità enzimatica di demolizione della molecola che, se lasciata integra, sarebbe neurotossica (sostanze lipofile che attraversano la cuticola, vanno nel sistema nervoso centrale e disattivano alcuni circuiti). Tuttavia ci sono principi attivi alternativi di cui però dobbiamo essere consapevoli.

Sulle zanzariere si può fare un'operazione aggiuntiva: si possono trattare le zanzariere con gli stessi principi attivi visti essere efficaci contro i flebotomi, come piretroidi, derivati dei piretroidi, permetrina, quindi molecole in grado di uccidere gli insetti quando si posano sulle zanzariere. Doppio effetto: 1) schermo meccanico; 2) uccisione degli insetti per contatto che provano a marcare quello schermo.

__ Vaccino per la Malaria __

E' chiaro che il target più interessante da un punto di vista di efficacia dello strumento, capacità nel medio/lungo termine di lotta antimalarica, è rappresentato dai vaccini.

Se si elabora il vaccino giusto si risolvono gran parte dei problemi: si risolvono a livello di popolazioni residenti, a livello di protezione dei viaggiatori, a livello di casi di importazioni, etc.

Ci sono 25 vaccini antimalarici in fase di sperimentazione, significa che ci possono essere delle prove di efficacia in vitro, prove di efficacia sugli animali da esperimento, si sono identificati coorti di pazienti volontari sui quali somministriamo e valutiamo gli effetti, etc.

C'è uno dei vaccini già in somministrazione in 3-4 Stati africani che sta dimostrando che c'è una relativa efficacia contro la malaria infantile. C'è effettivamente questo vaccino, lanciato sul campo nel 2019, ma se andiamo a vedere le informazioni reali, si conclude che si funziona, ma potrebbe fare molto meglio.

Viene fuori che tre dosi del vaccino con **RTS,S/AS01** erano protettive contro la malaria ma di fatto questo risultato è incompleto perché non abbiamo informazioni su quanto dura la protezione e su che tipo di protezione ci sia in funzione delle dosi somministrate.

E' un vaccino che va benino ma alla fine si conclude che questo ha un'efficacia di prevenzione non inferiore a quella derivante dalla chemioprevenzione cioè dalla somministrazione di derivati del chinino in soggetti potenzialmente esposti alla malaria.

La raccomandazione sostanziale sarà una sola: usare tutti i sistemi possibili senza affidarsi al vaccino perché lo stato attuale di questo non è sufficiente a considerarsi un presidio di primo livello per debellare la malaria in quanto la popolazione vaccinata è numericamente ancora ridotta, perché non sappiamo nel tempo cosa succede.

Tuttavia questo vaccino è un ricombinante molto interessante perché ha una parte che è un pezzo immunogenico della proteina Circum Sporozoitica (quella di adesione che consente di trovare la cellula target) che ha una capacità di stimolazione sui linfociti molto alta.

Come faccio a farla arrivare? Prendo un pezzo dell'epatite B che è quello che il virus utilizza per andare ad attaccarsi e farsi internalizzare nelle cellule target, fondo le due cose e ottengo uno pseudovirus (immunogenico ma in grado di entrare nelle cellule).

Il problema è che si "comporta" in maniera varia a seconda del ceppo di plasmodio, quindi non riesco ad elaborare un vaccino che sia protettivo contro tutti i ceppi malarici e allora attualmente stanno lavorando su tutte le altre strade, altri bersagli.

Nota bene: la fusione con la parte di una molecola caratteristica dell'epatite B ha un doppio effetto: questi vaccini proteggono un po' anche contro l'epatite B che ricordiamo essere la principale causa di morte delle malattie infettive che girano nelle zone malariche (AIDS, ebola, febbri tetaniche, dissenteria, malnutrizione, nematodi, malaria, leishmania, etc.) quindi si deve trovare un sistema che protegge in maniera multifattoriale. Questi vaccini hanno un moderato potere protettivo contro l'epatite B.

Un altro problema è la necessità di immunizzare soggetti con più vaccini perché oggettivamente costa, dosi multiple sono difficili e nello stesso tempo c'è un'attenzione a far sì che vengano immunizzati nel modo corretto e con le dosi minime i soggetti effettivamente bisognosi di immunizzazione per non indurre nel sistema immunitario degli effetti collaterali.

Prospettive future → trovare vaccini che siano più polivalenti e non abbiano effetti di selezione su sottogruppi per esempio sesso-specifici (proteggono meglio i maschi e meno le femmine o viceversa).

Infine, ci sono principi che si chiamano **imidazopirazine** che sono degli interferenti contro la fase pre-eritrocitica → principi attivi che sembrano aver dato una certa efficacia nel topo (animali da esperimento) e che sono in via di sviluppo per la medicina.

Principi attivi anti-malarici

L'anti-malarico maggiormente utilizzato e conosciuto il **chinino**, ma oltre a questo vi sono anche **cloroquina** e **meflochina**.

Ci sono zone in cui i ceppi malarici sono ancora sensibili al trattamento con questi principi attivi, altre invece dove c'è resistenza a questi principi attivi.

L'entità del problema dovuto al fatto che le modalità di somministrazione e tempistica erano ideali per selezionare geneticamente ceppi meno sensibili a questo principio attivo.

Infatti quel determinato pool genico subisce delle mutazioni casuali di cui quelle premianti stabiliscono quei caratteri per quel genoma.

Es. Se si espone ad un pool genico una dose di chinino che in realtà è sub letale, si selezionerà quel ceppo di plasmodi che andranno avanti e trasmetteranno questo genoma a quelli successivi.

Moltiplicando per molte volte questo meccanismo, si assiste alla comparsa di areali dove è inutile la sottoposizione a quei principi attivi.

Quindi a questo punto sarà necessario:

- Utilizzare dei farmaci alternativi (Artemisia annua)
- Generare dei vaccini

N.B: Youyou Tu la ricercatrice, che ha vinto il premio nobel nel 2015, implicata nella ricerca di nuovi principi attivi anti-malarici. Ha isolato Artemisia annua, ma non l'ha scoperta lei poichè l'estratto di questa pianta veniva usato come anticoncezionale. Gli estratti della pianta venivano fatti bollire in acqua, questo per far sì che la molecola perdesse il suo principio attivo. Quindi la Tu ha fatto le estrazioni a bassa T riuscendo ad ottenere delle molecole che mantenessero un principio di efficacia.

Dall'Artemisia annua si detrae l'**artemisina** che viene combinata a due principi che sono:

- **Artemetere**
- **Lumefantrene**

Sono principi che sono usati spesso a seconda della fase della malaria e del tipo di solubilità.

Le formulazioni possono avvenire per via parenterale, quindi sono lipoaffini o idrosolubili.

Molte nazioni hanno adottato il farmaco come antimalarico pediatrico principale, tuttavia il ciclo di produzione dipende dalla velocità di crescita della pianta, quindi non è possibile soddisfare tutte le richieste di mercato.

La soluzione potrebbe essere rappresentata dalla produzione di precursori dell'artemisina attraverso la ingegnerizzazione di batteri.

Quindi si fa un plasmide, si mette dentro il suo promotore e si integra nel genoma batterico, si coltivano batteri che rilasciano l'artemisina in soluzione (allo stesso modo si fa l'insulina).

Ma l'artemisina è un antibatterico e quindi l'unico modo per produrre artemisina, a livello industriale, quello di fare le plantule in vitro e dal germoplasma estrarre il principio.

Per quanto riguarda lo sviluppo di vaccini, si sta attuando lo sviluppo di vaccini che abbiano efficacia protettiva di almeno il 75%; ma su questo c'è poca ambizione perchè ci basta già soltanto trovare il target di azione.

Inoltre importante trovare un vaccino che riduca la trasmissione del parassita e riduca l'incidenza della malaria umana; quindi fare in modo che il soggetto non contragga la malattia e che se infetto, non sia in grado di trasmetterla attraverso vettori ad altri soggetti.

Per sviluppare un vaccino, è necessario sviluppare saggi immunologici con procedure standardizzate e reagenti che consentano la comparazione tra le risposte immunitarie evocate dai vaccini. Chiunque si accinga a sviluppare un vaccino bisogna che abbia degli standard di comparazione per sapere di aver sviluppato un buon vaccino.

Bisogna quindi confermare meccanismi e target di questi vaccini usando modelli di malaria umana (modelli animali) appropriata.

Ci sono molti principi di sintesi che possono funzionare, non come vaccini ma come chemioterapici.

Es. Si è identificato l'enzima fosfatidilinositolo-4-OH chinasi PI(4)K come target della imidazopirazina che

è un nuovo composto antimalarico che inibisce lo sviluppo intracellulare di specie molteplici di plasmodi.

I target principali dei vaccini che si stanno sviluppando adesso sono adesine: molecole di superficie che

stanno sugli eritrociti o fase liberamente circolanti dei parassiti. Questo espediente viene usato per

identificare anticorpi che sono funzionali ad una reale difesa antimalarica.

