

Cari Osanti, bentrovati, in questo numero ci occuperemo di un'innovativa scoperta per la diagnosi e la cura del del tumore della vescica, scoprendo così tutte le potenzialità nascoste presenti nelle urine; esamineremo poi come la moderna ricerca human based, sia fondamentale per lo studio degli effetti sull'uomo indotti da tossine ambientali o da residuati di trattamenti pesticidi come il glifosato, rivelandosi importante sia nella ricerca mirata ai singoli effetti d'organo, sia per quella generale sistemica. Infine, all'indomani del primo xenotrapianto di cuore da un maiale ad un essere umano, cercheremo di riportare il focus dell'attenzione su tutte quelle strategie d'intervento a breve e lungo termine già in uso, che non aspettano altro che ricevere adeguato sostentamento per progredire e migliorare nella prevenzione e nella terapia mirata delle patologie cardiache.

Nuove metodiche di studio nella ricerca del tumore della vescica

Table 1

Table summarizing contents of urine derived extracellular vesicles as potential biomarkers in cancer reserach. (A) Summary of extracellular vesicle RNA biomarkers and their functions. (B) Summary of extracellular vesicle protein biomarkers and their functions.

Biomarkers	Function/Association
A. RNA	
miR-200	Epithelial-to-mesenchymal transition
miR-375	Associated with high grade bladder cancer
miR-146	Associated with low grade bladder cancer
HOTAIR	Tumor initiation and progression
LINC00335	Cell migration and invasiveness
UCA1-203	Cell proliferation, migration, invasiveness and drug resistance
MALAT1	Cell proliferation and motility and inhibition of apoptosis
B. Proteins	
Mucin-1	Pathogenesis of many cancers
Carcinoembryonic antigen (CEA)	Angiogenesis and immune evasion
Epidermal growth factor receptor kinase 8-like protein	Associated with endometrial cancer and part of the epidermal growth factor receptor pathway
Moesin	Cancer metastasis
Tumor associated calcium signal transducer 2	Cell surface receptor that transduces intracellular calcium

[Open in a separate window](#)

Foto in <https://doi.org/10.3390/cancers13030422>

Il tumore della vescica è in assoluto la forma maligna più frequentemente riscontrata nell'apparato urinario, con una prevalenza globale stimata a 1,1 milioni di casi in 5 anni. Solo negli Stati Uniti ogni anno si riscontrano 80.000 nuovi casi e 18000 decessi. Il 90% dei tumori è rappresentato dal carcinoma uroteliale nelle due forme non invasiva/invasiva della muscolatura, quest'ultima a più alto rischio di generare metastasi. Il 75% dei pazienti a cui è stato diagnosticato un cancro della vescica ad alto rischio, sono destinati nei dieci anni successivi a sviluppare metastasi, ad avere recidive o al decesso. Molti pazienti non rispondono alle terapie chemioterapiche o in risposta ad esse presentano severi effetti collaterali. Per questo motivo è più che mai necessario sfruttare le nuove metodiche a disposizione per dare nuova linfa alla ricerca di terapie efficaci e supportate dall'organismo umano. Questo studio ha concentrato la sua attenzione sugli studi molecolari della componente urinaria cellulare ed extracellulare, in pazienti affetti da tumore. L'urina sta a stretto contatto con l'urotelio e dunque rappresenta un serbatoio ideale di cellule tumorali esfoliate e di particelle solubili (ad esempio proteine) di origine tumorale, in generale di sostanze utili alla diagnostica del tumore. Tra queste un ruolo significativo lo svolgono le EV vescicole extracellulari (esosomi), prodotte da qualsiasi tipo di cellula, comprese quelle tumorali. Queste vescicole, poste sulla superficie esterna della membrana cellulare, contengono molecole di DNA, RNA,

lipidi e proteine in grado di riflettere la rispettiva origine cellulare. Si è scoperto che lungi dall'essere semplici vescicole contenenti scarti cellulari, in realtà questi esosomi rappresentano dei facilitatori della comunicazione intercellulare, attraverso il trasporto e il rilascio di mediatori dalla cellula progenitrice a quella bersaglio. Gli EV si possono riscontrare in una certa abbondanza e questo è di gran lunga più vantaggioso rispetto alla quantificazione di fattori scarsamente presenti e con breve emivita, come sono invece le cellule tumorali circolanti e il relativo DNA. All'interno degli esosomi il DNA e l'RNA sono impacchettati e protetti dalla degradazione da un doppio strato fosfolipidico, garantendogli così un valore diagnostico, prognostico e di monitoraggio in corso di terapia. Per altro, mentre il DNA circolante derivato dalle cellule tumorali viene rilasciato solo da cellule apoptotiche, le vescicole sono prodotte da cellule metabolicamente attive, il che è di estrema rilevanza in corso di patologia tumorale. A questo punto ci si è concentrati sul differenziare il contenuto delle vescicole presenti in soggetti sani, rispetto a quello delle vescicole prodotte in soggetti affetti da carcinoma vescicale. In primo luogo si è visto che il composto più abbondante è rappresentato dall'RNA e nello specifico l'80% da mRNA e RNA ribosomiale. Sono state individuate sequenze di mRNA associate alla transizione epiteliale-mesenchimale e appartenenti a cellule tumorali altamente invasive, a causa della perdita delle proteine epiteliali che favorivano l'adesione cellulare. Altre sequenze di mRNA sono state associate a forme tumorali di basso grado, altre ancora a forme tumorali ad alto grado. La sequenza di RNA non codificante HOTAIR, sequenza già nota anche in altre forme tumorali per il suo ruolo nell'accelerare la nascita del tumore e favorirne inoltre la progressione, è stata riscontrata anche nei pazienti affetti da tumore della vescica. La rimozione di questa sequenza dalle linee cellulari del tumore vescicale ha mostrato una riduzione nel potenziale di migrazione e di invasione cellulare, offrendo così le premesse per un possibile futuro uso terapeutico. Sono state individuate poi altre tre sequenze di RNA non codificanti presenti in modo predominante proprio nelle forme tumorali e che possono dunque rappresentare degli ottimi biomarkers. Lavorando altresì sul DNA contenuto nelle vescicole si è visto che anch'esso può costituire un biomarker nella diagnosi tumorale, in quanto in esso si ritrovano delle mutazioni che sono presenti nelle stesse cellule tumorali, fornendo così elementi di approfondimento sulla genetica del carcinoma vescicale. Gli studi si sono poi concentrati sulle proteine contenute nelle vescicole, sia quelle in soluzione sia quelle di membrana. In quest'ultimo caso nonostante siano stati eseguiti studi di proteomica (anche autorevoli) che hanno identificato potenziali marcatori proteici, a causa della difformità nell'esecuzione dei medesimi, di fatto non ci sono pareri univoci e consolidati in merito.

In tutto questo, una sfida da vincere riguarda la profilazione in toto degli EV presenti nell'urina; considerando che prostata, reni, tratto urinario superiore e urotelio sano sono in grado di produrli, si rende indispensabile discriminare le sole vescicole di origine tumorale sulle quali fare ricerca. Questo è possibile mediante tecniche volte all'identificazione del marker tumorale sulla membrana esosomica. Un esempio è rappresentato dalle uroplachine, una famiglia composta da 4 proteine altamente glicosilate e site sulla superficie di membrana, contribuiscono alla formazione e al grado di permeabilità della placca urotelica. Queste uroplachine non sono prodotte da cellule estranee al tessuto uroteliale e soprattutto sono prodotte ad alto dosaggio solo da cellule tumorali, dunque rappresentano un ottimo elemento per effettuare lo screening degli esosomi di origine tumorale. Se per il tumore alla vescica le tecniche sono in via di definizione per poi passare all'uso clinico, gli stessi principi sono già stati applicati con successo nella diagnostica del tumore prostatico. In quest'ultimo caso infatti si utilizza un isolamento massivo di esosomi dalle urine e si effettua una RT-pcr per misurare l'espressione di tre geni che sono sovraespressi in corso di tumore prostatico. Questo test denominato con l'acronimo EPI è stato inserito dal NCCN (National Comprehensive Cancer Network) nelle linee guida per la diagnosi precoce del cancro alla prostata, sia per quanti affrontano la prima biopsia sia per coloro che la ripetono.

Minkler S, et al. Emerging Roles of Urine-Derived Components for the Management of Bladder Cancer: One Man's Trash Is Another Man's Treasure. *Cancers* (Basel). 2021 Jan 23;13(3):422. doi: 10.3390/cancers13030422.
<https://doi.org/10.3390/cancers13030422>

Utilizzo degli organoidi cardiaci ed epatici per testare tossine ambientali e derivati di trattamenti pesticidi

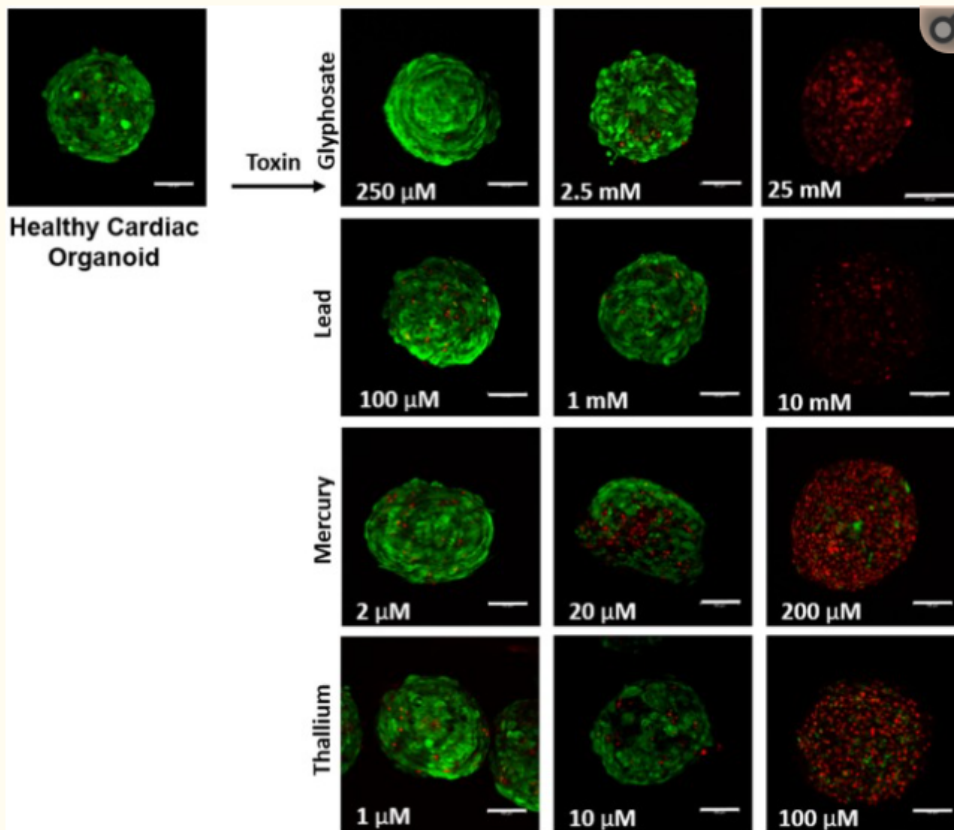


Figure 2

Visual assessment of environmental toxin effects on cardiac organoids by live/dead assay. The effects of glyphosate, lead, mercury, and thallium on cardiac organoids using ethidium homodimer dead (red) and calcein AM live (green) staining. Scale bars are equal to 100 μm .

Foto in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5932352/>

L'esposizione a tossine ambientali, metalli pesanti e altre molecole tossiche derivanti ad esempio da trattamenti pesticidi, è a livello mondiale un problema di salute pubblica di primaria importanza. L'utilizzo di terreni e acque contaminate rappresenta la principale forma di interazione con queste sostanze. Oggi conosciamo molto più approfonditamente che in passato gli effetti avversi di queste sostanze, vediamo dunque alcuni:

-l'esposizione ai metalli pesanti è causa di danni cellulari e tissutali, con significative complicazioni soprattutto nei bambini; risulta implicata in disturbi gastrointestinali, neurologici (incluso lo spettro autistico), cardiaci ed epatici; è in grado di alterare la funzionalità degli organuli cellulari, dei lipidi di membrana e degli enzimi citoplasmatici. I metalli pesanti sono poi in grado di interagire con gli acidi nucleici e le proteine del nucleo, determinando alterazione del DNA, morte cellulare e forme tumorali.

-i metalli pesanti non sono i soli composti tossici, ne esistono molti altri presenti ad esempio nei trattamenti pesticidi in grado di provocare danni non solo alla salute umana ma altresì alla fauna selvatica, alcuni dei quali banditi come il DDT. Da sottolineare che oltre all'intossicazione acuta, queste sostanze possono determinare disturbi cronici quali il cancro, il diabete, disfunzioni endocrine, malattie neurodegenerative e potenziali alterazioni epigenetiche.

Solitamente gli studi hanno previsto l'utilizzo di modelli animali e di colture cellulari 2D, entrambe se pur per ragioni diverse risultano non abbastanza specifiche e pertanto fuorvianti sui meccanismi di tossicità che si realizzano in vivo. Ma esiste un'altra possibilità che è rappresentata dai tessuti 3D, volti a costituire gli organoidi bioingegnerizzati in questo caso di fegato e di cuore, derivanti totalmente da linee cellulari umane. L'obiettivo dello studio in questione era quello di testare su organoidi di cuore e di fegato, alcune sostanze già ben note e conosciute, ma solo per gli studi su modelli animali o 2D. I criteri di valutazione della risposta cellulare alle tossine in esame, sono stati tre: quantificazione dell'ATP cellulare, test di vitalità/citotossicità e test del battito cardiaco. Il modello si è rivelato utile sia per uno studio degli effetti sistemici, che per quelli mirati su singolo organo. Le attività tissutali in risposta alle sostanze tossiche si sviluppano con maggiore rapidità, più facilmente e con meno dispendio economico di quanto avviene con altri modelli di ricerca. Inoltre, la combinazione dei diversi test eseguiti sugli organoidi, consente di avere un quadro di tossicità più completo e di carattere anche progressivo. L'obiettivo finale è quello di comparare e correlare i dosaggi plasmatici delle tossine, con quanto rilevato negli organoidi per dimostrare la reale efficacia di questa metodica nella diagnostica di tossicità e altresì nello sviluppo di terapie, ad esempio quelle chelanti per i metalli pesanti.

Le sostanze testate sono il glifosato, il tallio, il piombo ed il mercurio. Il glifosato che permane nel raccolto anche dopo il taglio, è responsabile di alterazioni sui recettori endocrini e di tossicità epatica. Potenzialmente esistono correlazioni

anche con il cancro, il Parkinson, l'infarto e il diabete. Il piombo incentiva la formazione dei radicali dell'ossigeno, a loro volta in grado di interferire e inibire le specie antiossidanti derivanti dal glutatione. Inoltre, interferendo con gli scambi ionici di alcuni ioni positivi (ferro, magnesio e calcio), determina citotossicità diretta ed indiretta. Per quanto concerne il mercurio sono meglio conosciuti gli effetti sul sistema nervoso, ma esistono tutta una serie di effetti più generali che includono il legame con i tioli, l'alterazione dell'omeostasi dei canali del calcio, la capacità di influenzare la miosina ATPasi nelle cellule cardiache. Infine il tallio, che in virtù della sua carica positiva (tende facilmente ad ossidarsi) viene sostituito dalle membrane con il potassio, arrecando malfunzionamento della pompa sodio-potassio; infine è in grado di alterare la membrana degli organuli citoplasmatici compresi i mitocondri e agisce a livello dei siti sulfidrilici degli enzimi.

Forsythe SD, et al. Environmental Toxin Screening Using Human-Derived 3D Bioengineered Liver and Cardiac Organoids. *Front Public Health*. 2018 Apr 16;6:103. doi: 10.3389/fpubh.2018.00103. eCollection 2018.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5932352/>

Primo xenotrapianto al mondo di cuore, da un maiale ad un uomo, siamo sicuri sia corretto puntare tutto sul trapianto?



Foto in <https://www.pcrm.org/news/good-science-digest/animal-organs-human-bodies-disservice-patients>

Il recente trapianto di cuore da un maiale ad un individuo umano, primo caso al mondo, non è motivo di celebrazioni e soprattutto non dovrebbe offuscare tutto quanto esiste già da tempo con finalità preventiva e curativa nei confronti delle patologie cardiache.

Lo xenotrapianto presenta serie problematiche sia da un punto di vista etico, sia medico-scientifico.

Cominciamo con il dire che i trapianti anche quando hanno luogo tra individui, dunque tra appartenenti alla stessa specie, espongono sempre il paziente a gravi rischi di immunosoppressione indotta dalle terapie anti-rigetto, che a sua volta può esitare in infezioni molto difficili da debellare. Sicuramente avremo presto la possibilità di avere maggiori dettagli circa tutto quanto si è reso necessario per rendere possibile l'impianto, e per mantenere il paziente nelle fasi ad esso successive, ma ciò che intanto già oggi sappiamo è che esistono concrete possibilità di azione su vari fronti, che necessiterebbe solo di un adeguato sostentamento, per essere ulteriormente potenziate e sviluppate.

Molto pragmaticamente si sottolinea come gli Stati Uniti, paese in cui ha avuto luogo lo xenotrapianto, dovrebbero in primo luogo investire su una transizione alimentare da una dieta eccessivamente ricca e squilibrata, a una dieta prevalentemente vegetale senza dimenticare l'importanza di associare l'esercizio fisico. Questi due elementi oltre ad essere considerati fondamentali per la prevenzione delle patologie cardiache, sono risultati migliorativi in primi studi di carattere pionieristico in chi è affetto da patologia cardiaca moderata o grave.

Vi sono poi tutta una serie di attività cosiddette "rigenerative", che hanno lo scopo di migliorare lo stato morboso, senza arrivare al trapianto. E' questo il caso del restauro ventricolare, che consente di ripristinare la forma e il volume del ventricolo normale; un altro caso di medicina rigenerativa è quella che prevede l'uso di cardiomiociti prodotti a partire da cellule staminali embrionali umane e pluripotenti indotte o quello di dispositivi di assistenza meccanica alla circolazione, resi ormai sempre meno invasivi. Ovviamente ciascuna di queste tecniche ha un target di azione, che le rende o meno fruibili nei diversi pazienti in base alle loro caratteristiche di malattia.

Sarebbe auspicabile che gli investimenti fossero diretti al miglioramento della sicurezza e dell'efficacia dei farmaci attualmente in uso, determinando così anche una significativa diminuzione nella necessità di trapianto d'organo. A questo riguardo, l'esistenza odierna di organi-on chip di cuore in grado di mimare efficacemente il tessuto cardiaco, offre una possibilità concreta di sperimentare nuovi farmaci in modo efficace.

Poiché il trapianto rimane in molti casi un'opzione obbligata, si ricorda che per incrementare il numero di organi umani disponibili, in primo luogo si potrebbe procedere con il sistema di donazione opt-out (ovvero tutti coloro che muoiono sono considerati automaticamente donatori, salvo aver manifestato dissenso). Si sottolinea poi che si potrebbe incrementare il numero di organi fruibili allargando i criteri per i donatori, e soprattutto migliorando le tecniche di mantenimento di temperatura e battito post rimozione; ma ancora migliorando i processi per l'abbinamento donatore-ricevente e quelli per la diagnosi e la gestione delle forme di rigetto.

Animal Organs in Human Bodies a Disservice to Patients. Physicians Committee for Responsible Medicine. *GOOD SCIENCE DIGEST* Feb 3, 2022.

<https://www.pcrm.org/news/good-science-digest/animal-organs-human-bodies-disservice-patients>