



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Dipartimento di Scienze della Vita
XXI Ciclo del Dottorato di Ricerca in Scienze Biomolecolari

Settore scientifico-disciplinare BIO/10 (Biochimica)

APPLICAZIONI DELLA GLICOBIOLOGIA
ALL'*IMAGING* MOLECOLARE

Dottorando

Dr. Anna Flamigni

Coordinatore

Prof. Franco Vittur

Università degli Studi di Trieste

Relatore

Prof. Sergio Paoletti

Università degli Studi di Trieste

Correlatore

Dr. Anna Coslovi

Università degli Studi di Trieste

RIASSUNTO

SCOPO DELLA TESI	1
-------------------------	---

INTRODUZIONE GENERALE:

I.	La Cartilagine	4
	I.1. I componenti della Cartilagine Articolare	6
	I.2. La Membrana Sinoviale	6
	I.3. I Condrociti	7
II.	Le Patologie Articolari	9
	II.1. Osteoartrite	10
	II.2. Artirite Reumatoide	12
III.	Glicobiologia delle patologie articolari	14
	III.1. Tipi Molecolari	14
	III.2. Le Galectine	21
	III.3. Galectina-1	24
	III.4. Galectina-3	26
IV.	Metodi Diagnostici: l' <i>Imaging</i> Molecolare	31

PARTE A: ANALISI DELLE PATOLOGIE ARTICOLARI A LIVELLO MOLECOLARE: Determinazione delle Interazioni tra Biopolimeri Modificati e Componenti Molecolari e Cellulari di Strutture Cartilaginee

1.	CLUSTERIZZAZIONE DI UNITA' GALATTOSIDICHE	39
1.1.	INTRODUZIONE: SUPPORTI PER LA CLUSTERIZZAZIONE DEL GALATTOSIO	39
	1.1.1. Chitosano e Chitlac	41
	1.1.2. Destrano	43
	1.1.3. PAMAM	44
1.2.	MATERIALI E METODI	45
	1.2.1. Sintesi dei Derivati del Chitosano:	47
	1.2.1.1. Chitlac a Diversi Gradi di Sostituzione	47

1.2.1.2. Chitlac a Diverso Peso Molecolare	47
1.2.2. Sintesi del Derivato del Destrano: DexLac	48
1.2.3. Sintesi del Derivato del PAMAM: PAMAMLac	48
1.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	49
1.4. CONCLUSIONI	56
2. STUDI DI AFFINITA' TRA CHITLAC E GALECTINE	57
2.1. INTRODUZIONE:	57
2.1.1. Interazioni Indipendenti e Cooperative	57
2.1.2. Surface Plasmon Resonance	63
2.2. MATERIALI E METODI	65
2.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	66
2.4. CONCLUSIONI	68
3. EFFETTI DEL CHITLAC SU COLTURE CELLULARI	70
3.1. INTRODUZIONE:	70
3.1.1. Scelta delle Linee Cellulari	70
3.1.2. Citofluorimetria a Flusso	70
3.1.3. Microscopia Confocale	72
3.2. MATERIALI E METODI	74
3.2.1. Determinazione dell'Internalizzazione dei Polimeri	75
3.2.1.1. Citofluorimetria a Flusso	76
3.2.1.2. Microscopia Confocale	76
3.2.2. Determinazione degli Effetti sul Ciclo Cellulare	76
3.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	77
3.4. CONCLUSIONI	83

PARTE B: ANALISI DELLE PATOLOGIE ARTRITICHE A LIVELLO TISSUTALE:

Valutazione delle Potenzialità di Sistemi Galattosilati in Diagnostica

4. TECNICHE DIAGNOSTICHE PER IMMAGINI	87
4.1. INTRODUZIONE	87

4.1.1. Risonanza Magnetica Nucleare	90
4.1.2. Imaging Ottico	94
4.1.3. Modelli Sperimentali di Artrosinovite	97
4.2. MATERIALI E METODI:	99
4.2.1. Ancoraggio di Molecole Sonda a Strutture Saccaridiche di Riconoscimento Molecolare	99
4.2.2. Animali ed Esperimenti <i>in Vivo</i>	102
4.2.2.1 MRI	102
4.2.2.2 Test di Immunogenicità	102
4.2.2.3 Imaging Ottico	103
4.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	104
4.3.1. Ancoraggio di Molecole Sonda a Strutture Saccaridiche di Riconoscimento Molecolare	104
4.3.2. Animali ed Esperimenti <i>in Vivo</i>	110
4.3.2.1 MRI	110
4.3.2.2 Test di Immunogenicità	111
4.3.2.3 Imaging Ottico	113
4.4 CONCLUSIONI	117
CONCLUSIONI GENERALI E PROSPETTIVE FUTURE	122
BIBLIOGRAFIA	127
RINGRAZIAMENTI	147

Riassunto

I carboidrati sono stati per molto tempo considerati molecole aventi solo funzioni di tipo strutturale e di riserva energetica per la cellula e non sembravano in alcun modo coinvolti nei processi che contribuiscono allo sviluppo di una cellula completamente funzionante. Nuove ed accurate ricerche hanno dimostrato il ruolo svolto dai carboidrati in numerosi processi biologici al punto che attualmente essi sono considerati la terza categoria di macromolecole con caratteristiche bio-informative. I carboidrati sono strutture che possono dare una quantità di informazioni estremamente elevata; l'innumerabile variabilità dei legami con cui le unità monosaccaridiche possono costituire strutture più complesse, permette ai carboidrati di utilizzare un linguaggio estremamente eloquente. Questo linguaggio ha preso il nome di *Glicocodice*.

I decifrotori del glicocodice sono tipicamente proteine leganti gli zuccheri chiamate lectine, caratterizzate da un'elevata specificità; lectine in grado di riconoscere in modo specifico unità β -galattosidiche, chiamate galectine, risultano coinvolte in numerosi processi che regolano l'omeostasi cellulare, tra cui le interazioni cellula-cellula, cellula-matrice, ma anche i sistemi apoptotici ed il differenziamento cellulare. Inoltre esse risultano strettamente correlate con lo sviluppo di numerose patologie tra cui i tumori e le infiammazioni articolari come l'osteoartrite e l'artrite reumatoide.

In particolare, la galectina-1, molecola regolatrice pro-apoptotica, risulta sovraespressa nei pazienti affetti da artrite reumatoide. Al contrario, l'aumentata espressione della galectina-3 risulta essere un fattore rilevante per lo sviluppo di patologie osteoartritiche.

Le convenzionali metodologie di indagine diagnostica per immagine sono purtroppo strumenti deboli per l'analisi di patologie croniche, in particolare risulta difficile la distinzione tra stadio acuto e cronico e l'identificazione di fasi iperacute. E' per questo motivo che è così complessa la distinzione tra l'artrite reumatoide e le altre patologie osteoarticolari nelle prime fasi della malattia. La messa a punto di metodologie in grado di fornire una diagnosi precoce e precisa è dunque uno dei passi fondamentali nella lotta all'artrite reumatoide. Oggi sono disponibili test di tipo immunologico a livello sierico e tecniche di *imaging* in grado di dare alcune informazioni importanti sulla natura e sul decorso della malattia. Tuttavia questi risultano essere strumenti ancora carenti per una diagnosi precoce della patologia.

Nella moderna era della medicina molecolare, terapie geniche e terapie cellulari potranno essere studiate direttamente e indirettamente tramite l'uso dell' *imaging* molecolare.

L'utilizzo di tecniche di *imaging* funzionale e molecolare assieme a strumenti di immagine anatomica, può indubbiamente incrementare la specificità e la sensibilità della diagnosi. Le procedure di indagine molecolare dovrebbero essere dunque considerate importanti strumenti complementari alle tecniche di indagine per immagini utilizzate correntemente in clinica.

Nuovi mezzi di contrasto per MRI in grado di interagire a livello molecolare potranno dunque incrementare il potenziale di questa tecnica. Inoltre, l'emergere di nuove tecniche di diagnostica per immagini che utilizzano metodi ottici (fluorescenza e bioluminescenza), che sono attualmente di comune utilizzo in modelli animali in fase pre-clinica, sono in corso di sviluppo per la loro applicazione anche sull'uomo.

Il presente progetto di dottorato ha avuto come obiettivo la messa a punto di un sistema diagnostico per immagini che permetta di individuare precocemente e con alta specificità la presenza di patologie artritiche infiammatorie, in modo tale da diagnosticare la malattia artritica nei primi stadi del suo sviluppo, ma anche di discriminare la tipologia e la prognosi, al fine di poter applicare una corretta e tempestiva strategia terapeutica.

Per realizzare tale obiettivo, nel corso del dottorato di ricerca, sono state sviluppate strategie sintetiche di nuovi mezzi di contrasto in grado di individuare *markers* specifici della patologia artritica, successivamente utilizzati su modelli cellulari e animali. In particolare, come bersaglio per tali mezzi di contrasto sono state individuate le galectine.

Per ottenere l'interazione con le galectine i nuovi mezzi di contrasto devono contenere sonde per la diagnostica per immagini coniugate con strutture opportunamente modificate con ramificazioni di galattosio, al fine di permettere il legame selettivo alle galectine ed indicarne la presenza.

Il progetto è stato articolato in due parti:

Parte A, Analisi delle Patologie Articolari a Livello Molecolare. In questa fase sono stati sintetizzati complessi polimerici che potrebbero aiutare la comprensione dello sviluppo delle patologie articolari a livello molecolare. In particolare è stata effettuata la *clusterizzazione* di unità galattosidiche, note sonde biologiche per le galectine. La scelta delle strategie sintetiche è stata effettuata a partire dalla conoscenza del biopolimero Chitlac, composto le cui caratteristiche chimico/fisiche erano già ben note nel nostro laboratorio e a cui sono state riconosciute capacità di influenzare la crescita dei condrociti. Per meglio comprendere le interazioni e gli effetti di tale polisaccaride con molecole biologiche e colture cellulari, sono stati effettuati studi a livello molecolare e *in vitro*.

In primo luogo si è quindi determinata la costante di affinità del Chitlac per le galectine-1 e -3, successivamente sono stati condotti studi di internalizzazione del Chitlac da parte di cellule presentanti un elevato numero di recettori per il galattosio (cellule di epatocarcinoma) e di condrociti primari, oggetto principale della nostra ricerca. I risultati ottenuti, hanno permesso di stabilire che il polisaccaride viene internalizzato negli epatociti in misura maggiore e in condrociti, in misura inferiore. Ne è seguito uno studio sull'effetto che il Chitlac svolge sul ciclo cellulare di tali cellule. Il risultato ottenuto ci ha indotti a pensare che il Chitlac sia in grado di interferire con le strutture che regolano il ciclo cellulare presumibilmente interferendo proprio con le galectine, proteine che controllano a monte l'espressione di proteine regolatrici dei *checkpoint* del ciclo cellulare. Questi risultati potrebbero finanche suggerire l'utilizzo del Chitlac non solo come sonda diagnostica ma anche come possibile agente terapeutico.

Parte B, Analisi delle Patologie Artriche a Livello Tissutale. Unità galattosidiche sono state ancorate a sonde per MRI, tra cui il DTPAGd (Magnevist®) presente in commercio e comunemente utilizzato in clinica, al fine di ottenere sonde maggiormente selettive nei confronti di patologie presentanti alterazioni dell'espressione di lectine. Come atteso, l'aggiunta dei gruppi ossidrilici dello zucchero ha portato ad un aumento dell'indice di rilassività rispetto alla sonda commerciale con conseguente miglioramento dell'immagine MRI ottenuta dopo l'iniezione endovenosa del complesso di gadolinio.

Infine, il Chitlac è stato utilizzato per evidenziare patologie artriche in modelli animali tramite l'utilizzo dell'*imaging* ottico. A tale scopo, il polimero è stato coniugato con la sonda fluorescente Cy5.5. Le iniezioni intra-articolari del polimero hanno evidenziato le sole articolazioni patologiche, mentre il Chitlac è stato rapidamente allontanato dalle articolazioni sane. Una prima prova per via endovenosa ha inoltre permesso di verificare la permanenza nell'articolazione del polimero che dunque appare non subire un significativo sequestro da parte del fegato, come poteva essere ipotizzabile dai risultati ottenuti *in vitro*.

Dagli studi condotti nel corso del presente progetto di tesi, è possibile concludere che la *clusterizzazione* del galattosio induce un incremento dell'affinità nei confronti delle galectine-1 e -3. Inoltre il polimero Chitlac (chitosano lattosilato) si è dimostrato in grado di interagire a livello cellulare al punto da influenzare il ciclo cellulare. Ulteriori studi potrebbero permettere una migliore comprensione di tali eventi. Infine, la possibilità di studiare condrociti derivanti da tessuti di articolazioni patologiche potrebbe permettere di valutare se in tali condizioni l'alterazione dell'espressione delle galectine possa essere tale da aumentare l'internalizzazione del polimero nelle cellule malate ed i suoi effetti sul ciclo cellulare.

Studi preliminari *in vivo* su modelli di animale artritici, hanno permesso di evidenziare la permanenza del Chitlac nella articolazioni degli animali patologici, diversamente dagli animali sani, suggerendo un potenziale uso del polisaccaride nella discriminazione delle due tipologie di articolazione, effetto non evidenziabile con l'utilizzo di due polisaccaridi di controllo (chitosano e destrano), cioè privi del sostituito galattosio.

SCOPO DELLA TESI

I carboidrati sono stati per molto tempo considerati molecole aventi solo funzioni di tipo strutturale e di riserva energetica per la cellula e non sembravano in alcun modo coinvolti nei processi che contribuiscono allo sviluppo di una cellula completamente funzionante. Nuove ed accurate ricerche hanno dimostrato il ruolo svolto dai carboidrati in numerosi processi biologici al punto che attualmente essi sono considerati la terza categoria di macromolecole con caratteristiche bio-informative. I carboidrati sono strutture che possono dare una quantità di informazioni estremamente elevata; l'innumerabile variabilità dei legami con cui le unità monosaccaridiche possono costituire strutture più complesse, permette ai carboidrati di utilizzare un linguaggio estremamente eloquente. Questo linguaggio ha preso il nome di *Glicocodice*.

I decifrotori del glicocodice sono tipicamente proteine leganti gli zuccheri chiamate lectine, caratterizzate da un'elevata specificità; lectine in grado di riconoscere in modo specifico unità β -galattosidiche, chiamate galectine, risultano coinvolte in numerosi processi che regolano l'omeostasi cellulare, tra cui le interazioni cellula-cellula, cellula-matrice, ma anche i sistemi apoptotici ed il differenziamento cellulare. Inoltre esse risultano strettamente correlate con lo sviluppo di numerose patologie tra cui i tumori e le infiammazioni articolari come l'osteoartrite e l'artrite reumatoide.

In particolare, la galectina-1, molecola regolatrice pro-apoptotica, risulta sovraespressa nei pazienti affetti da artrite reumatoide. Al contrario, l'aumentata espressione della galectina-3 risulta essere un fattore rilevante per lo sviluppo di patologie osteoartritiche.

Le convenzionali metodologie di indagine diagnostica per immagine sono purtroppo strumenti deboli per l'analisi di patologie croniche, in particolare risulta difficile la distinzione tra stadio acuto e cronico e l'identificazione di fasi iperacute. E' per questo motivo che è così complessa la distinzione tra l'artrite reumatoide e le altre patologie osteoarticolari nelle prime fasi della malattia. La messa a punto di metodologie in grado di fornire una diagnosi precoce e precisa è dunque uno dei passi fondamentali nella lotta all'artrite reumatoide. Oggi sono disponibili test di tipo immunologico a livello sierico e tecniche di *imaging* in grado di dare alcune informazioni importanti sulla natura e sul decorso della malattia. Tuttavia questi risultano essere strumenti ancora carenti per una diagnosi precoce della patologia.

Nella moderna era della medicina molecolare, terapie geniche e terapie cellulari potranno essere studiate direttamente e indirettamente tramite l'uso dell' *imaging* molecolare.

L'utilizzo di tecniche di *imaging* funzionale e molecolare assieme a strumenti di immagine anatomica, può indubbiamente incrementare la specificità e la sensibilità della diagnosi. Le procedure di indagine molecolare dovrebbero essere dunque considerate importanti strumenti complementari alle tecniche di indagine per immagini utilizzate correntemente in clinica.

Nuovi mezzi di contrasto per MRI in grado di interagire a livello molecolare potranno dunque incrementare il potenziale di questa tecnica. Inoltre, l'emergere di nuove tecniche di diagnostica per immagini che utilizzano metodi ottici (fluorescenza e bioluminescenza), che sono attualmente di comune utilizzo in modelli animali in fase pre-clinica, sono in corso di sviluppo per la loro applicazione anche sull'uomo.

Partendo da tali premesse, questo progetto di Dottorato ha avuto come obiettivo la messa a punto di un sistema diagnostico per immagini che permetta di individuare precocemente e con alta specificità la presenza di patologie artritiche infiammatorie, in modo tale da individuare precocemente la malattia artritica ma anche di discriminare la tipologia e la prognosi, al fine di poter applicare una corretta e tempestiva strategia terapeutica.

Per realizzare tale obiettivo, è stato progettato lo sviluppo della sintesi di nuovi mezzi di contrasto da legare a composti in grado di individuare marker specifici della patologia artritica, ed all'applicazione di tali sonde a sistemi diagnostici per modelli cellulari e animali. In particolare, come bersaglio di tali mezzi di contrasto sono state individuate le galectine, una classe di proteine appartenenti alla famiglia delle lectine, che mostrano alta affinità per il galattosio e che è stato dimostrato essere sovraespresso in numerose patologie tra cui l'artrite reumatoide.

Per ottenere l'interazione con le galectine i nuovi mezzi di contrasto devono contenere sonde per la diagnostica per immagini coniugate con strutture opportunamente modificate con ramificazioni di galattosio, al fine di permettere il legame selettivo alle galectine e indicare la loro presenza.

Il progetto è articolato in due parti:

Parte A, Analisi delle Patologie Articolari a Livello Molecolare.

Scopo di questa parte del lavoro è la sintesi di complessi polimerici che possano aiutare la comprensione dello sviluppo delle patologie articolari a livello molecolare. In particolare si intende ottenere l'interazione con le galectine attraverso la *clusterizzazione* di unità galattosidiche, note sonde biologiche per le galectine, al fine di ottenere un'amplificazione di

un segnale “biologico”. La scelta delle strategie sintetiche seguite è stata effettuata a partire dalle conoscenze progresse sul biopolimero Chitlac, molecola le cui caratteristiche chimico/fisiche sono già ben note nel nostro laboratorio e a cui sono state riconosciute capacità di influenzare la crescita dei condrociti. Per meglio comprendere le interazioni e gli effetti di tale polisaccaride con molecole biologiche e colture cellulari, sono stati progettati studi a livello molecolare e *in vitro*.

Parte B, Analisi delle Patologie Artriche a Livello Tissutale.

L’ancoraggio di unità galattosidiche a sonde per MRI, tra cui il DTPAGd (Magnevist®) presente in commercio e comunemente utilizzato in clinica, ha come scopo l’ottenimento di sonde maggiormente selettive nei confronti di patologie presentanti alterazioni dell’espressione di lectine, e che possiedano al contempo una maggiore rilassività grazie ai numerosi gruppi ossidrilici, potenziali scambiatori di protoni con l’acqua, introdotti con lo zucchero.

Infine, lo studio *in vivo* del polimero Chitlac ancorato alla sonda per imaging ottico (Cy5.5) su modello animale di artrite ha come scopo la valutazione dell’effetto della clusterizzazione del galattosio sulla selettività della sonda per la visualizzazione e lo studio di patologie articolari.

INTRODUZIONE GENERALE

I. La Cartilagine

La cartilagine è un tipo di denso tessuto connettivale. Essa è composta da cellule specializzate, i condrociti, che esprimono abbondante matrice extracellulare. La funzione della cartilagine è di proteggere l'osso, a livello delle giunture, da forze di carico e d'impatto, e di annullare la frizione durante lo scorrimento delle superfici articolari. Essa si trova distribuita in tutte le aree del corpo, e in particolare sulla superficie delle ossa articolari, nella cassa toracica, nell'orecchio, nel naso, nei condotti bronchiali e nei dischi intervertebrali.

Le sue proprietà meccaniche sono intermedie tra quelle dell'osso e del tessuto connettivo denso, come i tendini. A differenza di altri tessuti connettivi, la cartilagine non è vascolarizzata ed i condrociti ricevono il nutrimento tramite processi di diffusione.

La matrice extracellulare (ECM) della cartilagine articolare è costituita da una componente proteica (collagene, elastina, laminina, fibronectina, condronectina e osteonectina) e dalla cosiddetta sostanza fondamentale, formata essenzialmente da proteoglicani e acido ialuronico. I proteoglicani, in prevalenza glicosaminoglicani (GAGs), costituiscono il 5-10% del peso del tessuto umido, mentre il 10-30% è costituito da collagene di tipo II. L'alto contenuto di proteine e carboidrati complessi con elevata carica elettronegativa permette il legame di una notevole quantità di molecole d'acqua, rendendo la matrice extracellulare altamente idratata, con un contenuto d'acqua pari al 60-80% (Kuettner, 1991).

Il collagene, di tipo II, IX e XI svolge un ruolo di tipo strutturale e conferisce resistenza e rigidità alla trazione. In particolare, il collagene di tipo II (il più abbondante) presenta una regione ricca di glicina nella sequenza Gly-X-Y, dove X e Y sono arbitrariamente gli amminoacidi idrossiprolina e prolina. Il network che il collagene forma legando proteoglicani e glicoproteine conferisce alla cartilagine stabilità alla tensione e resistenza meccanica.

Il collagene di tipo VI è localizzato a livello pericellulare attorno ai condrociti, mentre il collagene di tipo X si trova nella cartilagine in fase di calcificazione (Manicour 1999).

Il grado di compattezza assunta dai proteoglicani all'interno della struttura di collagene ne determina il livello di idratazione influenzando, dunque, anche la rigidità dell'articolazione.

Altre proteine, oltre al collagene, contribuiscono all'organizzazione della cartilagine. L'aggregano, con i suoi gruppi carichi, crea un ambiente osmotico che intrappola molecole

d'acqua all'interno della cartilagine contribuendone ulteriormente all'alta idratazione. Proteine oligomeriche della matrice cartilaginea (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*, COMP), presenti in elevata quantità attorno ai condrociti, stabilizzano il network di collagene, promuovendone la compattazione in fibrille, e regolando le interazioni cellula-matrice. Il componente proteoglicanico della matrice è costituito da un gel altamente concentrato (fino a 100 mg/mL) di proteoglicani immobilizzati in una matrice densa di fibrille di collagene. I GAGs più abbondanti nella cartilagine sono condroitin- e cheratansolfato, mentre l'acido ialuronico è l'unico proteoglicano non solfatato presente. Benché sia una componente minoritaria della cartilagine umana (<6% del peso totale), l'acido ialuronico svolge un ruolo importantissimo nella formazione degli aggregati di proteoglicani. Infatti, in condizioni normali, la maggior parte dei proteoglicani si presentano sotto forma di aggregati di più molecole legate ad una molecole di acido ialuronico (Hardingham 1983, Plaas 1983).

In base alla composizione dell'ECM si distinguono, istologicamente e funzionalmente, tre diversi tipi di cartilagine.

La cartilagine ialina, ricca di fibre di collagene II, è presente a livello delle articolazioni (cartilagine articolare) e delle prime vie respiratorie (setto nasale).

La cartilagine fibrosa, ricca di fibre di collagene I e II, si ritrova a livello dei dischi intervertebrali, dei menischi intra-articolari, della sinfisi pubica, dell'inserzione di tendini e legamenti.

La cartilagine elastica, costituita da fibre elastiche e collagene II, è rappresentata dalla cartilagine epiglottide, costituisce il sostegno del padiglione auricolare, delle trombe di Eustachio e della cartilagine dei bronchi più distali.

Il nostro interesse si è rivolto in particolare sulla cartilagine articolare. Essa riveste le superfici articolari ed ha lo scopo di facilitare una reciproca e più morbida concordanza dei capi articolari, riducendone l'usura nelle sollecitazioni fisiologiche e nei microtraumi.

1.1 Componenti della Cartilagine Articolare

La cartilagine articolare rappresenta il tessuto connettivo specializzato nel conferimento di resistenza alle forze di compressione, distribuzione dei pesi, riduzione degli attriti tra i corpi articolari, grazie alla presenza di liquido sinoviale prodotto dalla membrana sinoviale, costituente anch'essa la capsula articolare.

Si distinguono tre zone: *superficiale*, di *transizione* (o *intermedia*) e *profonda* (o *radiale*); ciascuna zona è caratterizzata da una diversa distribuzione delle fibre di collagene e da una diversa morfologia cellulare. Nella zona superficiale, le fibre sono fittamente impaccate in direzione tangente alla superficie articolare ed hanno tipicamente un diametro di $320 \pm 50 \text{ \AA}$ con una periodicità di 100 \AA . La matrice extracellulare, invece, è costituita da fibre più sottili (120 \AA di diametro) e, man mano che si passa nella zona profonda, si distribuiscono in maniera casuale, diventando via via più spesse e con aumentata periodicità, e dunque più distanziate tra loro (Zhu, 1993).

La cartilagine articolare non è vascolarizzata e la parte profonda della matrice cartilaginea, a contatto con l'osso, è mineralizzata, e dunque impermeabile; essa quindi forma una barriera tra cartilagine ed osso subcondrale insormontabile per i metaboliti. Per tale motivo, il trofismo della cartilagine articolare dipende non dall'osso subcondrale, ma, in minima parte, dai vasi periostali, e in misura maggiore dal liquido sinoviale che riempie la cavità articolare. Di conseguenza, una variazione metabolica del liquido sinoviale può causare enormi danni all'articolazione (Steinert, 2007).

La sintesi, l'incorporazione e la degradazione della ECM è orchestrata dai condrociti, cellule che popolano a bassa densità la matrice (Steinert, 2007). In vivo, essi sono costantemente soggetti a cambiamenti dell'ambiente idrostatico che ne modulano le attività metaboliche (Manicour, 1999).

1.2 La Membrana Sinoviale

La membrana sinoviale è un tessuto sottile che si trova tra le giunture bi-articolari rivestendo internamente la capsula articolare e la parte articolare dell'osso; essa è normalmente costituita da un sottile strato di rivestimento contenente cellule, e uno strato di sottorivestimento costituito da tessuto connettivo lasso. Lo strato di rivestimento produce molecole della matrice extracellulare e fluido sinoviale (Lipsky, 2007).

La membrana sinoviale mantiene al suo interno il liquido sinoviale che è presente nella cavità articolare, permettendo la lubrificazione delle articolazioni anche in presenza di forze d'impatto.

Lo strato di rivestimento della membrana sinoviale è costituito da due tipi di cellule: i fibroblasti ed i macrofagi.

I fibroblasti producono l'acido ialuronico, che intrappola l'acqua all'interno della sinovia, e la lubrificina che lubrifica le superfici articolari; mentre i macrofagi sono responsabili della rimozione di sostanze indesiderate dal fluido sinoviale (Edwards, 2003).

La membrana sinoviale può essere liscia oppure ricoperta da villi che probabilmente le permettono di adattarsi ai movimenti dell'articolazione (Edwards, 2003). Subito al disotto dello strato di rivestimento è presente una fitta rete di capillari che provvedono alla fornitura di nutrienti non solo per la sinovia, ma anche per la cartilagine che ricordiamo essere avascolare.

In condizioni patologiche, come nel caso di artrite reumatoide, il tessuto sinoviale può essere infiammato ed ispessito. Quando questo succede, il fluido sinoviale in eccesso che viene rilasciato dalla membrana infiammata può dar luogo ad una barriera che impedisce la diffusione di nutrienti alla cartilagine. Le cellule sinoviali possono anche prelevare un maggior quantitativo di nutrienti, azzerando i livelli di glucosio nel tessuto ed inducendo la morte per denutrizione delle cellule della cartilagine. Le cellule sinoviali, inoltre, possono produrre enzimi in grado di digerire la superficie cartilaginea (Edwards, 2003).

1.3 I Condrociti

I condrociti sono la sola componente cellulare della cartilagine. Sono cellule di derivazione mesenchimale che, una volta differenziate, producono e mantengono la matrice extracellulare del tessuto cartilagineo. Rappresentano l'1% del volume totale del tessuto (Stockwell, 1967) e variano per forma, dimensioni e attività metabolica a seconda dello strato cartilagineo in cui si trovano.

I condrociti della zona superficiale (zona I, in figura I.1) sono tipicamente di forma ovale, con l'asse cellulare orientato lungo la direzione della superficie articolare. Le cellule della zona di transizione (zone II e III) presentano un profilo più tondeggiante, mentre nella zona più profonda (zone IVA e IVB) sono disposte perpendicolarmente alla superficie articolare (Hunziker, 2002). Inoltre, le cellule della zona radiale hanno una più intensa attività biosintetica rispetto ai condrociti superficiali (Hunziker, 2002; Wong, 1996).

Apparentemente la diversa morfologia dei condrociti è un fattore importante per la meccano-trasduzione che regola la biosintesi cellulare (Hunziker, 2002; Wong, 1996).

Da ciò si deduce come condrociti estratti da strati diversi della cartilagine possano avere una diversa attività nella sintesi di ECM.

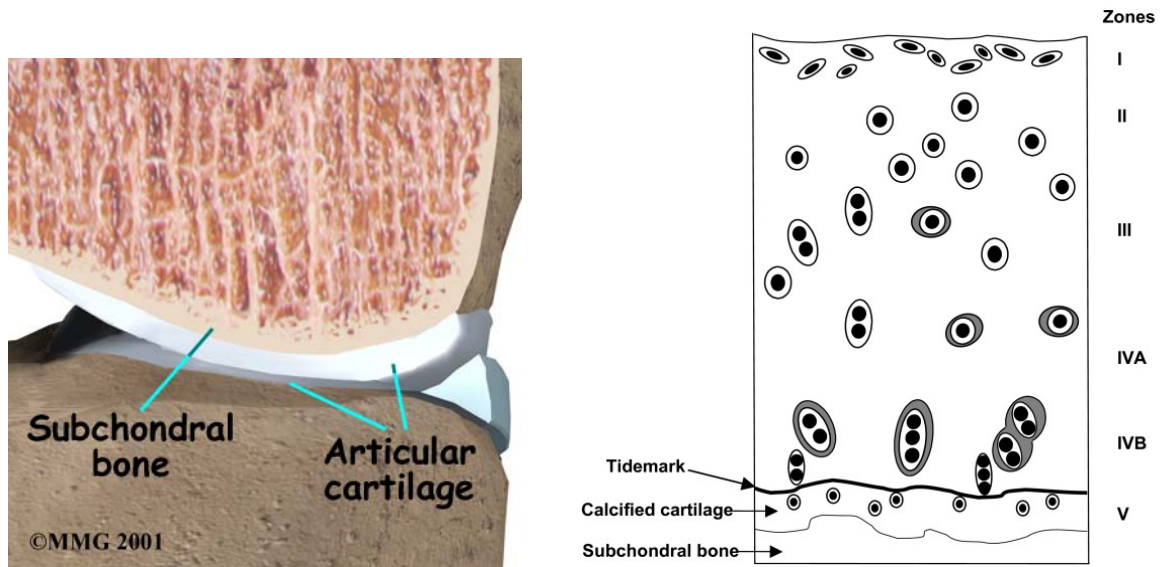


Figura I.1. La cartilagine articolare. Nel pannello a sinistra è rappresentata l'anatomia della cartilagine articolare del ginocchio. A destra sono rappresentate le diverse zone della cartilagine articolare: passando dalla zona I alla zona IVB si va dai condrociti superficiali a quelli radiali. Nella zona V si trova la cartilagine calcificata e al di sotto di essa l'osso subcondrale.

L'importanza della cartilagine risiede anche nella formazione delle ossa dello scheletro. Lo sviluppo dello scheletro, infatti, dipende dalla differenziazione dei condrociti e dalla stretta correlazione tra sintesi e degradazione della matrice extracellulare.

La maggior parte delle ossa si formano dal processo di ossificazione endocondrale, durante il quale la cartilagine viene sostituita dall'osso. Tale processo avviene a livello della diafisi e della epifisi. La differenziazione diafisale dei condrociti porta alla formazione di due strutture simmetriche, i così detti "piatti di crescita", costituiti da colonne di differenziazione dei condrociti che progrediscono gradualmente dallo stato proliferativo a quello ipertrofico. I piatti di crescita mantengono la loro struttura generale durante la crescita di ossa lunghe e si distanziano durante la formazione di osso mineralizzato tra di essi. Durante la differenziazione dei condrociti avvengono cambiamenti nell'espressione delle molecole costituenti la matrice extracellulare (ECM) a livello del piatto di crescita. Infatti, i condrociti

esprimono collagene di tipo II durante la fase di proliferazione e maturazione; mentre esprimono collagene X quando differenziano in condrociti ipertrofici. La matrice attorno ai condrociti ipertrofici calcifica ed i condrociti vanno incontro a morte cellulare; le lacune vuote formatesi vengono poi invase dai capillari. Allo stesso tempo la matrice cartilaginea, parzialmente degradata, viene colonizzata dagli osteoblasti che sintetizzano osso trabecolare. Diverse molecole di segnale multiplo regolano la proliferazione e la maturazione dei condrociti. Poco è invece noto sulla differenziazione tardiva dei condrociti ipertrofici, o sulla loro morte programmata (Ortega, 2005).

II. Le Patologie Articolari

Secondo l'Arthritis Foundation [www.arthritis.org], nella dicitura "Artropatie" o "Malattie osteoarticolari," si includono circa 100 differenti patologie, di varia eziologia (metabolica, traumatica, infettiva, autoimmune o idiopatica) che possono colpire le articolazioni e il tessuto connettivo in tutto il corpo. Queste malattie generalmente causano dolori, gonfiori e spesso tendono a cronicizzare. Quelle di tipo cronico-evolutivo e potenzialmente invalidanti, affliggono in Italia circa 5.5 milioni di persone (Ciocci, 1999) con la seguente distribuzione:

- 1) Artriti, Artrosi, Osteoartrosi (70%),
- 2) Reumatismi extra-articolari (12,7%),
- 3) Artrite reumatoide (7,4%),
- 4) Spondilite anchilosante o spondilo-artriti (5,5%),
- 5) Gotta (2%),
- 6) Connettiviti (0,6%),
- 7) Reumatismo articolare acuto o Malattia reumatica (0,01%),
- 8) Altro (1,8%).

Tra queste, le più interessanti sono sicuramente l'osteoartrite, per l'alta incidenza e l'artrite reumatoide per la complessità della patologia e per la conseguente scarsità di terapie disponibili.

II.1 Osteoartrite

L'osteoartrite è la più comune malattia degenerativa che colpisce le articolazioni. Essa interessa tutti i costituenti dell'articolazione: cartilagine articolare, osso, membrana sinoviale e capsula articolare (L'Hermette, 2006).

Il concetto di osteoartrite ha subito negli ultimi anni un radicale cambiamento. La cartilagine è una struttura dinamica in cui sintesi e degradazione vengono mantenute sotto un costante controllo e l'osteoartrite rappresenta uno sbilanciamento in favore della degradazione. Essa dunque non è un semplice processo biomeccanico “*wear and tear*” come si sosteneva fino a qualche anno fa, ma risulta da eventi biochimici e molecolari che causano infiammazione e degradazione (Frizziero, 2008; Smith, 1999; Bush, 2003).

Nell'articolazione normale ci sono strette interdipendenze funzionali e metaboliche tra il liquido sinoviale, la cartilagine, la membrana sinoviale e l'osso subcondrale; negli stati avanzati dell'osteoartrite vi è un rapido turnover della matrice extracellulare ed una riduzione di tutti i suoi componenti.

Le prime alterazioni strutturali consistono nella necrosi delle cellule cartilaginee più superficiali ed in seguito anche della matrice extracellulare (*condrolisi*). Il decorso della patologia, autoalimentante, prevede l'attivazione di cascate di mediatori e citochine ad attività catabolica. All'origine dell'osteoartrite vi è un aumentato stress meccanico a cui la cartilagine è sottoposta e che può essere dovuto ad un'instabilità da lesioni legamentose, ad un eccesso di carico meccanico statico (peso, immobilizzazione) o a degenerazione senile (osteoartrite idiopatica o primaria). A tale stress segue un'alterazione dell'osso subcondrale con conseguente eccesso di carico sulla cartilagine normale. I condrociti adulti vengono dunque risvegliati dallo stato metabolico di riposo, stimolando la produzione di mediatori dell'infiammazione, tra cui citochine, chemochine e ROS (*Reactive Oxygen Species*). Tali fattori, assieme ai mediatori dell'infiammazione lipidici (prostaglandine e leucotrieni), aumentano l'attività catabolica dei condrociti, con conseguente rilascio di enzimi, tra cui aggrecanasi e metalloproteasi, che disgregano la matrice cartilaginea (Smith, 1999; Bush, 2003; Loeser, 2006). La disgregazione della matrice può essere una conseguenza del tentativo da parte dei condrociti di rimuovere la matrice danneggiata per poterla poi sostituire con della nuova matrice. Quando però l'individuo è adulto, i condrociti rispondono meno ai fattori di crescita; in tal modo da una parte non si attiva un segnale di “stop” alla degradazione della matrice, e dall'altra non si attivano segnali di sintesi di nuova matrice. Ne consegue una catena di eventi che porta allo sviluppo della patologia (Loeser, 2006).

Benché nell'artropatia degenerativa (osteoartrosi), per definizione non infiammatoria, la flogosi sinoviale sia usualmente poco evidente, viene riportato come in alcuni pazienti una forma evidente di sinovite possa assumere un ruolo importante anche nello sviluppo di alcune forme più evolutive di osteoartrosi, instaurando quindi aspetti più propriamente definibili di "osteoartrite" (Loeser, 2006).

Forme subcliniche e croniche portano ad osteoartrite anche a distanza di anni. Tipica di questa fase è l'erosione e la conseguente ulcerazione della cartilagine, che causa l'"esposizione" dell'osso, che appare più addensato (nei radiogrammi le superfici articolari sono più bianche rispetto al resto dell'osso). Ciò causa la formazione di osteofiti e cavità geodiche su entrambi i versanti articolari.

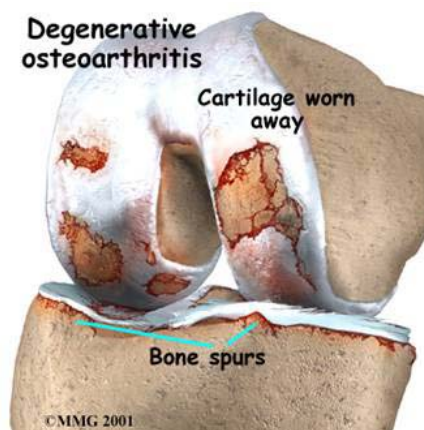
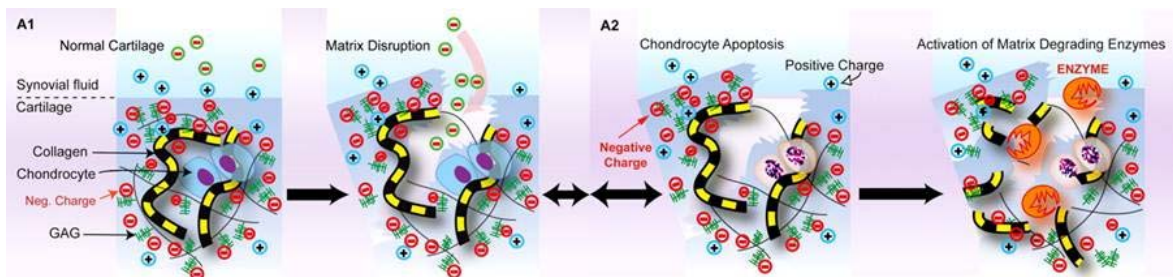


Figura II.1. Sviluppo dell'osteoartrite. Sopra, lo sviluppo dell'osteoartrite a livello molecolare. Sotto, una rappresentazione dell'anatomia di un'articolazione affetta da osteoartrite.

Ad oggi non vi è alcuna cura: i farmaci correntemente usati per la terapia dell'osteoartrite sono soprattutto rivolti alla diminuzione del dolore e al miglioramento della funzionalità articolare per ritardare il più possibile la rimozione dell'articolazione danneggiata e la sua sostituzione con un'articolazione artificiale. Nella *Guida all'Uso dei Farmaci-2008* distribuita dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), nella sezione "Terapia" è riportato quanto segue: "Bisogna ricordare che la terapia medica è solo palliativa".

Nel voler sviluppare nuovi farmaci *antiartrite*, così come nuovi mezzi di contrasto per la rilevazione precoce della patologia, è da tenere in considerazione che nella fase iniziale l'osteoartrite è asintomatica, poiché la cartilagine è sprovvista di innervazione ed il dolore compare solo quando l'infiammazione interessa i tessuti circostanti, come osso subcondrale, periostio, sinovia e capsula articolare, tutti altamente innervati e da cui dunque partono gli stimoli nocicettivi.

La diagnosi dell'osteoartrite viene abitualmente definita da criteri patologici e radiologici piuttosto che dal quadro clinico (Guida AIFA, 2008). Al momento in cui la patologia però è rilevabile con i comuni mezzi diagnostici (in particolare i raggi X), il danno è ormai irreversibile. Dal momento della prima analisi è necessario un *follow-up* di 1-2 anni per stabilire la progressione della malattia e l'effetto della terapia. Inoltre, tutte le immagini radiografiche forniscono una visione nel tempo, del danno già avvenuto anziché assegnare lo stato della progressione della malattia in un preciso momento. È dunque auspicabile trovare metodologie alternative per individuare variazioni nell'articolazione osteoartritica già agli inizi della patologia in maniera quantificabile, affidabile e sensibile.

II.2 Artrite Reumatoide

L'artrite reumatoide è una poliartrite infiammatoria cronica e progressiva a carico di tessuti sinoviali a patogenesi autoimmunitaria ed eziologia ignota. Colpisce tutto il corpo come poliartrite simmetrica associata ad interessamento dei tessuti peri-articolari, spesso accompagnata a stress fisico e psichico, ma anche ad una cattiva alimentazione o ad infezioni batteriche (Guida AIFA, 2008). Rispetto all'osteoartrite colpisce con meno frequenza e in età più giovane. Interessa l'1-2% della popolazione e il numero dei casi aumenta con l'età (l'esordio si osserva al termine dell'adolescenza o tra la quarta e quinta decade di vita, un secondo picco si osserva tra i 60 e 70 anni), mostrando una maggiore incidenza tra le donne (rapporto 3:1 con gli uomini). Per quanto riguarda i bambini, uno ogni mille ha una forma grave di artrite reumatoide giovanile. Sebbene non esista un dato ufficiale sul numero dei

malati di artrite reumatoide in Friuli Venezia Giulia, si calcola che la realtà regionale sia in linea con quella nazionale e cioè lo 0,5 per cento della popolazione.

Durante l'evoluzione dell'artrite reumatoide si sviluppa in particolare un'inflammatione a carico della membrana sinoviale in cui vi è un aumento sostanziale nello strato di sottorivestimento del numero di vasi sanguigni (angiogenesi) e del numero di cellule, con conseguente infiltrazione nello strato sottostante di cellule dell'inflammatione, come linfociti, macrofagi e mast cellule (Biswal, 2007). La produzione di citochine e proteasi da parte di tali cellule, assieme alla produzione locale di autoanticorpi, determina lo scatenamento di processi infiammatori cronici (Lipsky, 2007). Ne consegue un danneggiamento dei tessuti articolari, fino ad un danno osseo, per attivazione di enzimi proteolitici (collagenasi) derivanti dalla sinovia e prodotti dai condrociti, che erodono la matrice cartilaginea, mentre prostaglandine e proteasi derivanti dalla sinovia e in parte dagli osteoclasti, degradano il collagene I del tessuto osseo.

L'organismo sostituisce il tessuto danneggiato con tessuto cicatriziale facendo diventare gli spazi delle articolazioni stretti o addirittura inesistenti. Ne consegue l'irrigidimento e la deformazione delle articolazioni, tipiche della malattia. I sintomi dell'artrite reumatoide sono gonfiore e dolore alle giunture, stanchezza, anemia, perdita di peso e febbre.

Vi sono sostanzialmente due teorie sulla patogenesi dell'artrite reumatoide. La prima, illustrata in figura II.2, sostiene che le cellule T, attraverso l'interazione con un antigene non ben identificato, siano le prime responsabili per l'iniziazione della malattia con l'innescarsi dei processi infiammatori cronici. Questa teoria è basata sulla ben nota associazione tra l'artrite reumatoide e gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II e tra la presenza della patologia e un elevato numero di cellule T CD4+ (Biswal, 2007; Bathon)

La seconda teoria sostiene che, sebbene le cellule T potrebbero essere importanti per lo sviluppo iniziale della malattia, l'inflammatione cronica viene autoalimentata dai macrofagi e dai fibroblasti in maniera indipendente dalle cellule T. Questa teoria si basa sull'assenza di fenotipi di cellule T attivate in caso di artrite reumatoide cronica e la preponderanza, invece, dei fenotipi di macrofagi e fibroblasti attivati (Bathon).

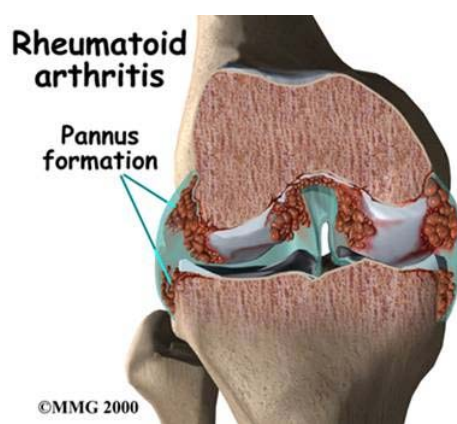
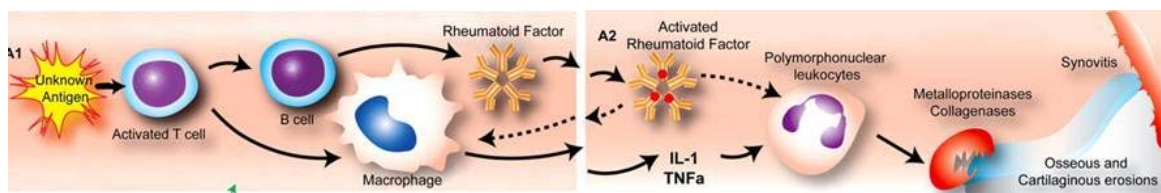


Figura II.2. Sviluppo dell'artrite reumatoide. Sopra, la teoria dello sviluppo dell'artrite reumatoide a partire dall'attivazione delle cellule T. Sotto, una rappresentazione dell'anatomia di un'articolazione affetta da artrite reumatoide.

III. Glicobiologia delle Patologie Articolari

In tutti i processi biologici, sia fisiologici che patologici, i carboidrati svolgono un ruolo fondamentale a lungo sottovalutato. Di seguito vengono descritte brevemente le principali specie saccaridiche o zucchero-correlate coinvolte nelle malattie della cartilagine.

III.1 Tipi molecolari

AGE (Advanced Glycation Endproducts)

Le glicosilazioni post-traduzionali non enzimatiche delle proteine avvengono per reazione di amminazione riduttiva tra l'estremità non riducente di uno zucchero e gruppi amminici primari che si trovano su proteine contenenti residui di lisina o arginina. Il successivo riarrangiamento di Amadori e dunque la reazione di imbrunimento di Maillard, produce i

cosiddetti Advanced Glycation Endproducts (AGE). Tali molecole non possono essere staccate dalle proteine e dunque per poter lasciare il tessuto è necessario che la proteina venga degradata. L'accumulo di AGE a livello cartilagineo ne riduce le proprietà meccaniche e ne altera il metabolismo. L'alterazione nella sintesi della matrice indotta dagli AGE potrebbe essere dovuta alla loro interazione con recettori per gli AGE. Tra di essi, AGE-R1 è l'oligosaccaril transferasi 48, AGE-R2 è la fosfoproteina 80 K-H, AGE-R3 è la galectina-3 ed infine RAGE è il recettore specifico per le AGE. RAGE è un membro della superfamiglia delle immunoglobuline in grado di legare più molecole di superficie cellulare. Esso è implicato nello sviluppo di diverse patologie tra cui diabete, malattie infiammatorie ed immuni, e tumori. AGE e RAGE sono entrambi presenti nella membrana sinoviale di pazienti osteoartritici a livello dello strato di rivestimento, dello strato di sotto-rivestimento e dell'endotelio. Oltre che nel fluido sinoviale, elevati livelli di AGE sono riscontrabili anche nel siero e nelle urine di pazienti osteoartritici.

Sembra che RAGE possa avere un ruolo non solo nell'induzione dell'osteoartrite, ma anche nella progressione della patologia.

L'accumulo di AGE nell'individuo è influenzato dai processi di invecchiamento, ma anche da altri fattori; per esempio, sembrano particolarmente soggetti allo sviluppo dell'osteoartrite pazienti affetti da diabete; sembra infatti che l'iperglicemia acceleri la formazione di AGE.

Alti livelli di AGE potrebbero stimolare vie cataboliche grazie alle interazioni con RAGE; la stimolazione di condrociti e sinoviociti fibroblasto-simili che ne deriva, incrementa la produzione di MMP-1, l'invasione e il rilascio di proteoglicani con conseguente degradazione della matrice extracellulare e rilascio di frammenti cartilaginei (Steenvoorden, 2006).

IgG

Nell'individuo sano, gli N-glicani delle IgG si trovano immobilizzati grazie all'interazione carboidrati-proteine. In particolare il complesso oligosaccaridico conservato di tipo "N-linked" al residuo Asn297 su ciascuna catena pesante del dominio CH2 occupa lo spazio interstiziale tra i domini e interagisce direttamente con i domini di superficie (Varki, 1999).

Tali strutture possono presentare uno o due residui galattosidici; vengono quindi identificati come glicani G1 o G2. Una piccola popolazione di IgG, può presentare la porzione oligosaccaridica de-galattosilata (G0) (Dwek, 1995).

L'assenza dei due residui galattosidici terminali, come nel caso dell'artrite reumatoide, risulta in una perdita di interazione tra i domini di superficie e l'oligosaccaride. Ciò permette un cambiamento conformazionale e la conseguente esposizione degli oligosaccaridi, rendendo

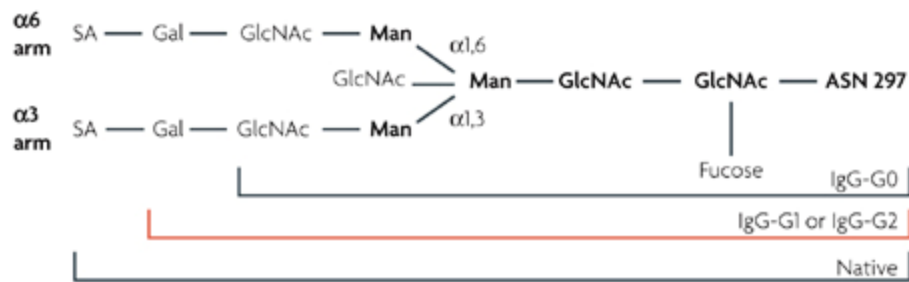
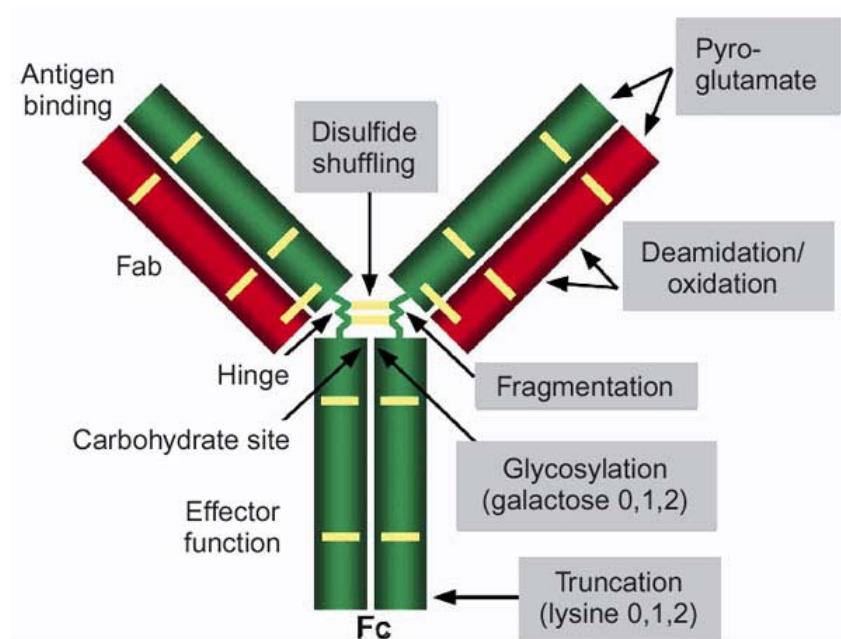
possibile il loro riconoscimento da parte di lectine endogene. Tale riconoscimento è influenzato dall'accessibilità degli oligosaccaridi, dal loro numero e dalla precisa geometria in cui si presentano. Tutti questi fattori introducono un alto grado di specificità e controllo (Varki, 1999).

Nell'artrite reumatoide, le strutture glicaniche di tipo G0 sono le più numerose. Alcuni studi hanno correlato la riduzione della galattosilazione delle IgG con la riduzione dell'attività enzimatica di β 1,4-galattosiltransferasi (GTasi) nei linfociti. Inoltre, le GTasi di pazienti affetti da artrite reumatoide presentano una normale affinità per le asialo-agalatto-IgG, mentre non mostrano affinità nei confronti di UDP-galattosio. Tali modifiche comportano un incremento della formazione di complessi immuni e attivazione del complemento (Watson, 1999).

Negli individui sani meccanismi di feedback positivo assicurano che i livelli di glicosiltransferasi aumentino quando il livello di galattosio sulle IgG diminuisce. Nell'artrite reumatoide ciò non avviene. Non solo l'attività delle glicosiltransferasi viene ridotta nei linfociti, ma si ha anche una variazione degli isoenzimi della galattosiltransferasi nel siero.

La degalattosilazione delle IgG espone la porzione Fc dell'immunoglobulina all'azione di "fattori reumatoidi". I fattori reumatoidi sono anticorpi diretti contro le IgG degalattosilate. Si tratta generalmente di IgM, a volte IgA (Rantapaa-Dahlqvist, 2003). La porzione glicosidica G0 risulta mobile e dunque riconoscibile dalle MBP (*Mannose-Binding Proteins*); tale riconoscimento induce l'attivazione diretta della cascata del complemento (Dwek, 1995; Varki, 1999). I livelli di G0 sono più elevati nel fluido sinoviale, in confronto al siero. E' probabile che a livello del fluido sinoviale, l'attivazione del complemento da parte delle MBP contribuisca allo scatenamento dell'infiammazione cronica della membrana sinoviale (Dwek, 1995).

La variazione della glicosilazione delle IgG, tuttavia non sembra essere un fattore discriminante per la patologia reumatoide in quanto variazioni nel pattern di glicosilazione delle immunoglobuline sono osservabili anche in altre patologie autoimmuni (Varki, 1999). Ipogalattosilazioni sono presenti anche nell'artrite giovanile idiopatica, artrite psoriatca e lupus eritematoso sistemico (Watson, 1999). Ci sono cambiamenti analoghi in altre patologie reumatiche, ma probabilmente i profili dei carboidrati delle IgG sono unici per ciascuna patologia. Per esempio, la relazione inversa tra i livelli di galattosio e di N-Acetilglucosamina sulle IgG dell'artrite reumatoide risultano assenti nella sindrome di Sjögren. E' dunque possibile una mappatura dei profili saccaridici delle IgG per associarle alle diverse forme reumatiche.



Nature Reviews | Immunology

Figura II.3. Rappresentazione schematica dell'IgG

Acido Ialuronico

Il fluido sinoviale è costituito da plasma ultrafiltrato e acido ialuronico (HA, figura II.4). L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano (GAG) prodotto dai sinoviociti fibroblasto-simili dello strato di rivestimento. Lo scatenamento di fenomeni infiammatori ne causa la depolimerizzazione, con conseguente diminuzione del peso molecolare e concentrazione. Le proprietà lubrificanti dunque diminuiscono contribuendo alla degradazione della cartilagine e dell'osso.

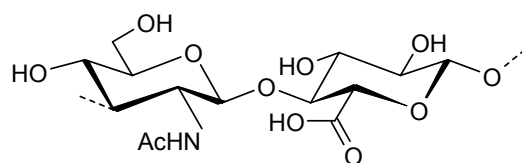


Figura II.4. Unità ripetitiva dell'acido ialuronico

L'acido ialuronico protegge le cellule e le strutture anatomiche contro sovraccarico meccanico date le sue proprietà viscoelastiche. Nei pazienti affetti da artrite reumatoide, la viscosità del fluido sinoviale è ridotta e può essere riportata a livelli normali per iniezione di HA esogeno. Sembra inoltre che l'HA esogeno sia in grado di stimolare la produzione di HA endogeno.

L'artrite reumatoide è caratterizzata dalla perdita di proteoglicani a livello delle giunture affette dalla malattia. HA presenta proprietà condroprotettrici e sembra inibire la perdita di proteoglicani della matrice della cartilagine delle giunture, così come protegge i condrociti da morte cellulare causata da radicali liberi, IL-1 e altre alterazioni. Iniezioni di HA esogeno inducono la diminuzione dei processi infiammatori e proliferativi del tessuto sinoviale, ed inibiscono la proliferazione e la migrazione di globuli bianchi, influenzandone l'adesione, la chemotassi e le proprietà fagocitiche (Moreland, 2003). Dall'altra parte, la degradazione di HA, ad opera delle specie reattive dell'ossigeno, ne potrebbe ridurre le proprietà protettive.

Sembra che l'HA abbia una finestra terapeutica limitata per il trattamento locale dell'artrite. Un aggravamento tardivo dei sintomi clinici di pazienti affetti da artrite e trattati con HA suggerisce addirittura la possibilità di effetti bifasici locali indotti da HA esogeno. Se tali effetti siano dovuti ad accumulo di HA oltre i livelli patologici (evitabile effettuando un'iniezione singola rispetto ad iniezioni ripetute) o ad effetti proinfiammatori dell' HA, resta da chiarire (Roth, 2005; Chang, 2005).

Sia nei pazienti osteoartritici (artrosici a componente rilevante flogistica locale) che in quelli affetti da artrite reumatoide, si riscontra una riduzione della concentrazione e del peso molecolare medio dell'HA nel fluido sinoviale del ginocchio. L'HA viene sintetizzato ad opera della ialuronano-sintasi (HAS) di cui esistono 3 diverse isoforme. Si suppone che l'acido ialuronico venga eliminato tramite il sistema linfatico o vascolare dopo frammentazione dovuta ad un processo sconosciuto, oppure cellule macrofagiche di tipo A dello strato di rivestimento che assorbono e digeriscono lo ialuronano.

Due isoforme, HAS-1 e HAS-2, sono sottoesprese nell'artrite reumatoide e nell'osteoartrite, mentre si ha una sovraespressione di HAS-3 nell'artrite reumatoide. Il diminuito messaggio di sintesi da HAS-1 e HAS-2 sarebbe la causa di un calo nella sintesi di ialuronano in entrambe le aptologie. L'aumentato messaggio da HAS-3 nell'artrite reumatoide potrebbe essere dovuto ad un'aumentata produzione di ialuronano da parte delle cellule infiammatorie. Tale incremento potrebbe proteggere le cellule infiammatorie o aiutarle nella migrazione, poiché resta localizzato a livello del sito d'infiammazione senza diffondere nella cavità articolare.

Dall'altra parte si ha un aumento del volume di ialuronano eliminato; infatti nell'osteoartrite e nell'artrite reumatoide si ha un incremento nell'attività della ialuronidasi 2 la quale digerisce l'acido ialuronico negli endosomi conseguentemente al suo *uptake* (Yoshida, 2004).

Alti livelli di HA rilevati nel siero, tuttavia non determinano con sicurezza la presenza della patologia reumatica poiché tale fattore risulta comune a diverse patologie e dunque non può ritenersi selettivo (Majeed, 2004).

Glicosamminoglicani

Il tessuto connettivo è composto da sottili strati di cellule separate da matrice extracellulare che contiene proteoglicani, costituiti a loro volta da glicosamminoglicani (GAGs) legati covalentemente a un nucleo di proteine tessuto-specifiche. I GAGs includono acido ialuronico, condroitin solfato A, B e C, eparina, eparan- e cheratansolfato. Essi costituiscono una famiglia di polisaccaridi altamente anionici, con unità ripetitive simili a base di acidi uronici e glicosammina. Cambiamenti a livello della natura molecolare dei GAGs sono stati associati a diverse malattie del tessuto connettivo. Ad esempio, pazienti affetti da artrite reumatoide e da sclerodermia hanno elevate concentrazioni di GAGs nel sangue e nel fluido sinoviale, e la distruzione delle giunture nell'artrite reumatoide correla con alti livelli di GAG nel fluido sinoviale. Nonostante queste evidenze, non è stata ancora indagata in modo esaustivo la possibilità che una risposta immunitaria aberrante contro i GAGs sia una causa dell'artrite reumatoide e di patologie analoghe.

I carboidrati sono generalmente considerati inerti o scarsamente immunogenici, per questo probabilmente non sono stati indagati come antigeni associati a patologie autoimmuni. In realtà è ben noto che matrici extracellulari ricche di GAGs sono la fonte per l'espressione in loco di fattori di crescita, nonché di altri agenti che controllano le funzioni cellulari. I GAGs inoltre possono interagire con diverse proteine in sede locale. E' stato dimostrato che la somministrazione di GAGs causa una malattia autoimmune del tessuto connettivo dei topi inducendo una sovra-espressione di recettore CD44 (Wang, 2002).

Molti fattori contribuiscono ad elevati livelli di GAGs. Infiammazioni, infezioni, o danni fisici possono portare al rilascio di GAGs solubili (Uesaka, 2001). Una reazione infiammatoria, indipendentemente dalle sue cause, porta ad un aumento della sintesi di HA nell'interstizio. I GAGs sono secreti durante l'attivazione di varie cellule, per esempio di quelle dell'endotelio e dei linfociti T. Inoltre, batteri patogeni espongono polisaccaridi di tipo GAGs sulla loro superficie. Per esempio, gli streptococchi di tipo A possiedono una capsula

ricca di HA. Anche i microrganismi secernono enzimi come ialuronidasi per rilasciare i GAGs dal connettivo. Benché molti agenti infettivi possano causare artriti infiammatorie, uno di questi potrebbe essere costituito proprio dai GAGs. I GAGs possono legarsi ai recettori di cellule di diverso tipo, come quelli per le citochine e a diversi recettori solubili, e inoltre sono in grado di legare simultaneamente più recettori, appartenenti a una sola o a più cellule. Essi potrebbero comportarsi da “superantigene” e produrre il segnale necessario per promuovere l’espansione delle cellule che li legano. Inoltre quantità anormali di GAGs possono modificare il microambiente e le dinamiche del sistema immunitario. Essi possono regolare i fattori emopoietici di crescita che favoriscono la produzione di cellule con recettori per i GAGs. E’ stato proposto che lo sviluppo della malattia reumatoide sia dovuto ad un’intrinseca anomalia dell’omeostasi cellulare causata dai GAGs, e non sia solo una conseguenza del riconoscimento dei GAGs da parte di recettori cellulari nel connettivo (Axford, 1997). L’inibizione della crescita e dell’adesione anormale di cellule immunitarie reattive ai GAGs potrebbe aprire la strada a nuove terapie per il trattamento dell’artrite reumatoide (Wang, 2002).

Acido Sialico

L’espressione di molti oligosaccaridi di glicoproteine viene alterata nel corso dell’artrite reumatoide e di altre patologie di tipo infiammatorio. I marker saccaridici più rilevanti di queste malattie sono l’antigene Lewis Y e l’acido sialico (figura II.5).

Quest’ultimo è uno zucchero la cui espressione è strettamente correlata con lo stato di salute dell’individuo: infatti molte patologie sono accomunate da un incremento dei livelli di acido sialico nel sangue. I più alti valori, che possono avere valore diagnostico, vengono registrati nel caso dell’artrite reumatoide e del tumore al colon (Stefanelli, 1985).

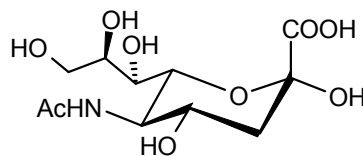


Figura II.5. Acido sialico

Le Galectine

Le galectine, proteine in grado di riconoscere selettivamente strutture recanti unità galattosidiche, sono anch'esse fortemente coinvolte nello sviluppo di patologie articolari. In particolare, la galectina-1, molecola regolatrice pro-apoptotica, risulta assente nel sito di invasione nei pazienti affetti da artrite reumatoide (Oshima, 2003).

L'iniezione di galectina-1 ricombinate ha inibito lo sviluppo dell'artrite indotta da collagene di tipo II in modelli animali tramite l'induzione dell'apoptosi dei linfociti T (Rabinovich, 1999; Oshima, 2003).

Al contrario, l'aumentata espressione della galectina-3 risulta essere un fattore rilevante per lo sviluppo di patologie artritiche.

Il coinvolgimento delle galectine nello sviluppo delle patologie articolari è per noi di primario interesse e verrà dunque ampiamente trattato nei paragrafi seguenti.

III.2 Le Galectine

In natura sono presenti molte proteine in grado di interagire in maniera non-covalente con i carboidrati. Queste includono enzimi specifici per i carboidrati e anticorpi sviluppati dal sistema immunitario come reazione ad antigeni a base saccaridica. Una terza classe di proteine specifiche per il legame con i carboidrati sono le lectine. Il nome "*lectina*" deriva dal latino *legere*, che significa pescare o scegliere. Le lectine legano in modo specifico e selettivo monosaccaridi, oligosaccaridi o parziali strutture saccaridiche, senza capacità catalitica e senza essere il prodotto di una risposta immune.

Negli invertebrati sono state identificate due principali classi di lectine: le lectine di tipo C, come le selectine o le pentraxine, che necessitano di calcio per legare i carboidrati e le lectine di tipo S, conosciute come galectine, calcio indipendenti, che sono state riscontrate in diverse specie a partire da *C. elegans* fino all'uomo (Gabijs, 2001).

Attualmente sono stati individuati 10 membri della famiglia delle galectine in base alla similitudine strutturale dei relativi domini leganti i carboidrati. Infatti, essi presentano tutti una sequenza aminoacidica di 130 aminoacidi, caratteristica nel sito di legame per i carboidrati (CRD, *Carbohydrate Recognition Domain*) e mostrano affinità di legame per le strutture β -galattosidiche.

In base alle loro caratteristiche strutturali, le galectine sono state suddivise in tre principali gruppi: *proto-type*, *chimera-type* e *tandem-repeat type*.

Le galectine *proto-type* sono piccole proteine di 15 kDa costituite da un solo CRD in grado di formare omodimeri divalenti e dunque legare due glicoconjugati di natura simile. A questo gruppo appartengono la galectina-1, -2, -5 e -7. Tranne la galectina-5, che si trova nella forma monomerica, le galectine *proto-type* si trovano in forma omodimerica con i monomeri legati tra loro da legame non covalente (Kasai, 1996).

Le galectine *chimera-type* (rappresentate dalla sola galectina-3) pesano 30-35 kDa e sono costituiti da due diversi domini: un'estremità C-terminale costituente il CRD ed un'estremità N-terminale correlata ai componenti del complesso ribonucleico eteronucleare (hnRNP) (Jia, 1988).

Le galectine *tandem-repeat* possiedono due CRD su una singola catena polipeptidica con specificità di legame diversa. Possono formare ponti tra glicoconjugati diversi tra loro. Le galectine -4, -6, -8 e -9 appartengono a questa tipologia strutturale.

Nel 1973 veniva pubblicato un articolo che giudicava altamente improbabile il coinvolgimento di lectine e glicani nel meccanismo generale di riconoscimento e comunicazione cellulare, del tipo descritto da Weiss nel 1947, asserendo che “*probabilmente ciascun elemento della coppia non è un comune componente cellulare*”. Questa visione è largamente cambiata nel tempo (Gabijs, 2001).

Le lectine svolgono ruoli cruciali negli scambi cellulari, nei processi di trasduzione del segnale e nell'infiammazione. Il ruolo delle lectine nell'infiammazione venne scoperto alla fine degli anni '80 tramite l'identificazione di selectine e dei rispettivi ligandi oligosaccaridici come mediatori per il richiamo di leucociti nei tessuti danneggiati. Recentemente anche le galectine hanno attratto l'interesse di molti immunologi in quanto regolatori chiave dell'omeostasi delle cellule dell'immunità e dell'infiammazione.

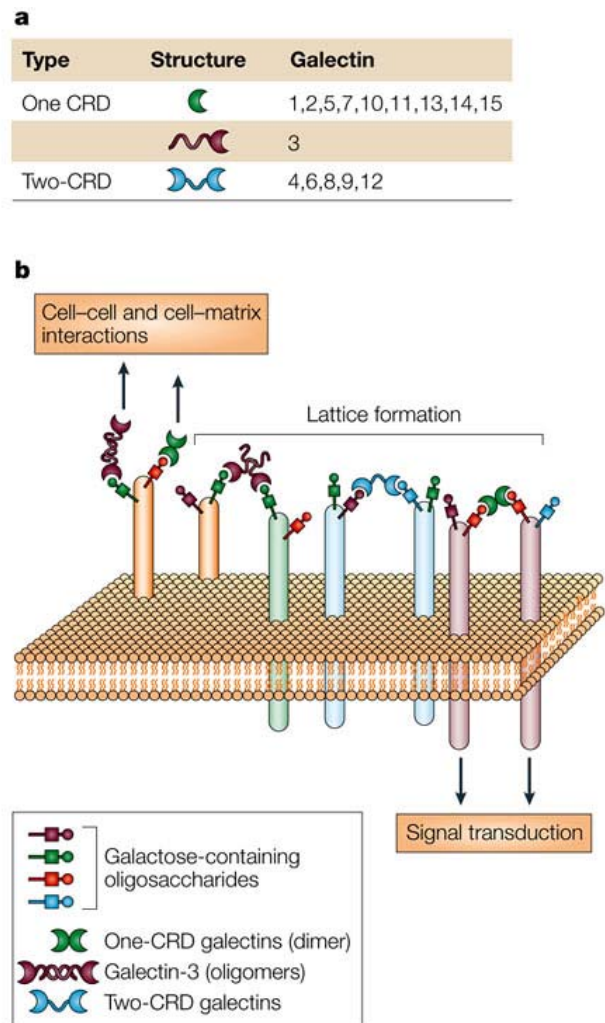
Le galectine si trovano distribuite sulla superficie cellulare e nella matrice extracellulare, così come nel citoplasma e nel nucleo.

Sintetizzate nel citosol, esse vengono rilasciate dalla cellula tramite un meccanismo secretorio non-classico essendo povere della sequenza per la traslocazione al reticolo endoplasmatico. Probabilmente tale meccanismo evita un legame prematuro delle galectine agli oligosaccaridi presenti sulle nascenti glicoproteine. Dopo la secrezione nel mezzo extracellulare, le galectine possono reticolare (“*crosslink*”) glicoconjugati contenenti unità β -galattosidiche presenti sulla superficie cellulare con conseguente modulazione di segnali cellulari, dell'adesione e della sopravvivenza cellulare.

Benché la maggior parte delle galectine siano state definite come proteine solubili confinate nei compartimenti citoplasmatici o rilasciate nella matrice extracellulare, la galectina-3 possiede anche un dominio di transmembrana (Rabinovich, 2002).

Le galectine hanno funzione modulatrice nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. Le galectine-1 e -3 hanno proprietà sia pro-adesive che anti-adesive, regolate dall'adesione di ligandi saccaridici presenti su glicoproteine di superficie e della matrice extracellulare, come fibronectina e laminina. La loro capacità di legare tra loro sia cellule dello stesso tipo che cellule differenti, così come di legare cellule alle proteine della matrice, rende loro capaci di modulare diversi processi come la mitosi, l'apoptosi e la progressione nel ciclo cellulare nonché in fenomeni di differenziamento, sviluppo, morfogenesi ed immunità (Rabinovich, 2002).

Figura III.1. Rappresentazione della famiglia delle galectine: strutture e ruoli biologici.



III.3 Galectina-1

La prima galectina ad essere individuata fu la galectina-1. Essa è un omodimero di subunità da 14 kDa. Poiché ciascuna molecola dimerica possiede due siti leganti galattosio, la galectina-1 può mediare sia legame intra- che intermolecolare. In tal modo la proteina può impedire il movimento o stimolare l'aggregazione delle glicoproteine.

Quando si trova ad alte concentrazioni, la forma prevalente della galectina-1 è quella di dimero: l'estremità N-terminale e C-terminale di ciascun monomero si trovano posizionati nell'interfaccia dei due dimeri ed i CRD si trovano localizzati alle estremità opposte (Lopez-Lucendo, 2004). L'integrità del dimero viene mantenuta principalmente grazie all'interazione a livello dell'interfaccia tra i monomeri e attraverso il core idrofobico. Tuttavia, una delle principali caratteristiche della galectina-1 omodimerica è la sua dissociazione spontanea a basse concentrazioni nella forma monomeric, che è ancora capace di legare carboidrati (Cho, 1995), ma con livelli di affinità minori (Lepänen, 2005).

Localizzazione della Galectina-1

La galectina-1, come tutte le proteine citoplasmatiche, presenta l'N-terminale acetilato ed è priva di glicosilazioni (Clerch, 1988). E' stata riscontrata sia nel citosol che nel nucleo e può traslocare nella porzione intracitoplasmatica della membrana cellulare e nell'ambiente extracellulare.

E' interessante notare come l'attività lectinica della galectina-1 sia prevalentemente a livello extracellulare, mentre a livello intracellulare la galectina-1 risulta coinvolta in interazioni proteina-proteina.

La galectina-1 si trova in molti tessuti sia normali che patologici; la sua espressione cambia durante lo sviluppo ed è controllata dal DNA. Per esempio, la galectina-1 è espressa nel cervello allo stato evolutivo e non nel cervello adulto (Perillo, 1998).

Interazione con i Carboidrati

L'attività lectinica della galectina-1 dipende dal suo sito di legame ai carboidrati (CRD). Il legame agli zuccheri e la stabilizzazione del complesso sono guidati dalla formazione di legami van der Waals e legami idrogeno tra la proteina e lo zucchero (Lopez-Lucendo, 2004). La costante di dissociazione della galectina-1 in forma dimerica con diverse glicoproteine è di circa 5 μ M (Symons, 2000) e sebbene essa legghi preferenzialmente glicoconjugati presentanti unità di N-acetilattosammina, i livelli di affinità di legame tra la proteina e il dimero risultano

relativamente bassi con una K_D di circa 50 μM (Ahmad, 2004). Tale affinità risulta aumentare, portando la K_D a circa 4 μM , all'aumentare del numero di ramificazioni contenenti il disaccaride (Ahmad, 2004). Inoltre, l'avidità di legame della galectina-1 verso i glicani aumenta qualora essi si trovino legati ad una superficie, come la superficie cellulare o la matrice extracellulare (He, 2004).

Coinvolgimento nelle Patologie Articolari

La galectina-1 induce inibizione della crescita cellulare e arresto del ciclo cellulare, ed è in grado di indurre apoptosi di cellule T attivate, ma non delle cellule T quiescenti. Inoltre, sulla superficie delle cellule T attivate sono espressi recettori in grado di legare la galectina-1, come i recettori CD45, CD43, CD2, CD3, CD7 e CD29. Quando avviene il legame, si osserva una redistribuzione di questi recettori in micro domini di membrana segregati (Rabinovich, 2004). Sembra che la regolazione dell'espressione di glicosiltransferasi, con conseguente formazione di ligandi presentanti N-acetilattosamina, durante lo sviluppo e l'attivazione delle cellule T, ne determini la suscettibilità alla galectina-1. Difatti, cellule T CD4^+ private della 2- β -1,6-N-acetilattosaminiltransferasi, risultano resistenti alla morte cellulare indotta da galectina-1 (Rabinovich, 2005).

Inoltre, anche la sialilazione delle unità di lattosilammina da parte della STGal-I sialiltransferasi porta ad un blocco del legame con la galectina-1 a causa dell'interferenza nell'inserzione della lattosilammina nella tasca di legame della galectina-1.

L'effetto pro-apoptotico della galectina-1 in molti casi avviene qualora siano presenti elevate concentrazioni di proteina (dell'ordine del micromolare). Sembra che la secrezione della galectina-1 da parte di diversi tipi cellulari sia sufficiente per causare la morte delle cellule T nel momento in cui la galectina-1 sia presente nella matrice extracellulare. Inoltre, la presenza della galectina-1 in cellule T attivate e non quiescenti suggerisce un potenziale ruolo della proteina in un suicidio autocrino indotto da meccanismi omeostatici. Basse concentrazioni di galectina-1 invece, inducono un segnale di arresto dell'adesione delle cellule T alle glicoproteine di matrice, come fibronectine e laminina e bloccano la produzione di citochine pro infiammatorie, come $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{INF-}\gamma$, senza indurre apoptosi (Rabinovich, 2005).

Per tutte queste evidenze, la galectina-1 è considerata una proteina che è in grado di regolare negativamente la risposta immune. Una somministrazione *in vivo* di questa proteina ha dimostrato di essere in grado di prevenire lo sviluppo di infiammazioni croniche e di migliorare condizioni patologiche come encefalo mieliti autoimmuni, coliti, epatiti e artriti. In

particolare è stato dimostrato come, attraverso la terapia genica, sia possibile in questo modo sopprimere l'infiammazione cronica in modelli animali di artrite reumatoide (Rabinovich, 1999).

III.4 Galectina-3

Nel corso dello sviluppo del sistema osteoarticolare, osteoclasti, osteoblasti e condrociti esprimono la galectina-3. Più precisamente, tale proteina viene espressa dai condrociti ipertrofici della zona di accrescimento dell'osso e risulta invece praticamente assente nei condrociti ipertrofici presenti nella zona di calcificazione durante la fase terminale di maturazione. Essa infatti sembra avere un ruolo chiave nell'omeostasi dei condrociti (Guévremont, 2004), essendo una proteina inibente l'apoptosi. A sostegno dell'esistenza di uno stretto legame tra maturazione condrocitaria e galectina-3, è noto che l'espressione di questa lectina è regolata dal fattore di trascrizione Runx2/Cbfa1, regolatore chiave nella differenziazione degli osteoblasti e nella maturazione dei condrociti (Ortega, 2005). Inoltre, essa assume un ruolo importante anche nella costituzione della matrice extracellulare, in quanto interagisce con molecole glicosilate dell'ECM, come laminina, fibronectina, AGE, integrine e proteine intracellulari (Bcl2) (Ortega, 2005).

Struttura

La galectina-3 è l'unico membro della famiglia della galectine di tipo "chimera", costituito da un dominio non-lectinico N-terminale, e un dominio lectinico C-terminale (CRD; Carbohydrate Recognition Domain) (Ahmad, 2004; Baptiste, 2007).

Sulla porzione N-terminale, sono presenti sequenze ripetute (*tandem repeats*) ricche in residui di prolina, glicina, alanina e tirosina, precedute, nei mammiferi, da una sequenza conservata di 18 aminoacidi che sembra possedere una propria funzione specifica (Ahmad, 2004; Domic, 2006) evidenziata dal blocco delle attività di segnale della proteina inducenti l'apoptosi (Domic, 2006) in conseguenza a delezione dei primi 11 aminoacidi.

Il dominio N-terminale è altamente conservato tra le molecole di galectina-3 isolate da diverse specie. Inoltre, presenta un'identità pari al 33.5% con la catena di collagene $\alpha 1$ (II) della cartilagine bovina, al punto da essere definito dominio N-terminale simil-collagene (Domic, 2006).

La porzione N-terminale è essenziale per le proprietà biologiche della galectina-3: oltre a partecipare al legame di oligosaccaridi al terminale CRD, essa è responsabile della

multimerizzazione della proteina che presenta una cooperatività positiva per il legame di lectine a cluster di ligandi immobilizzati (Ahmad, 2004; Dunic, 2006; Morris, 2004; Vrasidas, 2003); proprietà, questa, che sembra essere regolata biologicamente da metalloproteasi. Il dominio N-terminale sembra infatti essere suscettibile alla proteolisi selettiva MMP-2 e MMP-9 (Dunic, 2006). Una rottura enzimatica a livello di Ala⁶²-Tyr⁶³ della galectina-3 ricombinante, aumenta l'affinità del CRD verso i carboidrati, e al contempo diminuisce la multimerizzazione della galectina-3. Inoltre, la delezione dei primi 11 aminoacidi blocca la secrezione della proteina mentre una mutazione sulla Ser⁶, sito di fosforilazione, ha effetti negativi sull'attività antiapoptotica della galectina-3 e sul legame con carboidrati (Dunic, 2006).

Il terminale CRD è omologo a quello della galectina-1 e di altre galectine, tuttavia, la struttura cristallina della singola porzione CRD della galectina-3 indica la presenza della sola forma monomerica, a differenza della galectina-1 in cui invece tale porzione è presente in forma dimerica (Ahmad, 2004).

All'interno di tale dominio merita una speciale menzione la sequenza Asn-Trp-Gly-Arg. Tale sequenza, infatti, risulta presente anche nella famiglia delle proteine Bcl-2 ed è responsabile per l'attività antiapoptotica (Fukumori, 2007). Inoltre, essa risulta coinvolta nell'auto-associazione delle molecole di galectina-3 attraverso le CRD, in assenza di ligandi saccaridici (Dunic, 2006).

Benché si possa pensare che il dominio CRD non sia coinvolto nel legame con gli AGE, in quanto tale interazione non viene inibita dal lattosio (Mercer, 2004), sembra che il CRD possa contenere il principale sito di legame per gli AGE, che normalmente nella galectina intera viene nascosto dal dominio N-terminale, poiché è dimostrato che il solo dominio CRD presenta una maggiore affinità per gli AGE rispetto alla proteina intera (Dunic, 2006).

Il sito di legame per i carboidrati risulta essere un sito esteso che può accomodare anche polilattosaminoglicani.

Vi sono numerosi ligandi della galectina-3. Con alcune glicoproteine la galectina-3 interagisce attraverso un terminale N-acetilattosaminico, ma è anche in grado di interagire con svariate molecole non glicosilate, tramite interazioni proteina-proteina (Dunic, 2006).

Localizzazione e Funzioni Intra ed Extracellulari

La galectina-3, pur essendo prevalentemente presente nel citosol cellulare, si trova localizzata anche in organuli intracellulari tra cui nucleo e mitocondri ma anche nel comparto extracellulare (Baptiste, 2007).

La galectina-3 è sintetizzata su ribosomi liberi nel citoplasma, priva della sequenza segnale per la traslocazione nel reticolo endoplasmatico. Infatti, le galectine presentano un meccanismo di secrezione completamente nuovo, indipendente dal sistema reticolo endoplasmatico/Golgi, e che dipende invece dalla presenza della porzione N-terminale (Krześlac, 2004).

Lo step limitante affinché avvenga la secrezione della galectina-3 consiste nel suo accumulo sul versante citoplasmatico della membrana cellulare, determinato con ogni probabilità da proteine *heat shock* e da chaperonine; successivamente, si osserva un fenomeno di estroflessione della membrana nel punto di accumulo della proteina con conseguente rilascio di vescicole extracellulari che proteggono la galectina-3 dalla proteolisi (Baptiste, 2007; Krześlac, 2004). Altri studi dimostrano che la galectina-3 influenza l'endocitosi di integrine $\beta 1$ in modo simile alla modulazione dell'endocitosi degli AGE (Baptiste, 2007).

Inoltre, è stato dimostrato che la galectina-3 viene secreta e rientra all'interno della cellula tramite un meccanismo di meccano-trasduzione. Cellule sferiche e in sospensione secernano galectina-3 in modo costitutivo, mentre cellule distese ed adese prelevano galectina-3 dal medium extracellulare. Il meccanismo di meccano-trasduzione prevede il coinvolgimento di placche di adesione: esse rappresentano domini della membrana plasmatica che presentano sul versante citosolico proteine come vinculina, paxilina, actinina e talina, mentre sul versante extracellulare sono esposte le integrine. Il legame delle integrine con ligandi extracellulari, come la fibronectina, media le forze di adesione e di allungamento che vengono trasmesse da meccano-sensori ad organuli intracellulari tramite proteine del citoscheletro. Ne consegue una cascata di segnali coinvolti in meccanismi implicati nella crescita cellulare. Il distacco delle integrine dai ligandi extracellulari induce l'attivazione di un'altra serie di meccano-sensori da cui consegue una rapida e sostenuta secrezione di galectina-3. La differente grandezza e forma delle placche di adesione è una caratteristica che distingue le cellule con diverso grado di espressione della galectina-3 (Baptiste, 2007; Krześlac, 2004).

Una volta secrete per via esosomiale, le vescicole vengono lisate con conseguente rilascio della proteina che può quindi o legarsi alle sue controparti esposte sulla superficie della cellule, oppure alle componenti della matrice extracellulare, come laminina, fibronectina, elastina e collagene IV (Dumic, 2006). La proteina invia alle cellule segnali di sintesi e secrezione di collagene a cui sono legate le integrine, inducendo sempre per via meccanica, un ulteriore incremento dell'uptake della galectina (Baptiste, 2007). E' possibile, inoltre, che tali vescicole si fondano direttamente con altre cellule, rispetto alla cellula secretrice, con conseguente uptake intracellulare di galectina-3. Tale endocitosi avviene in maniera lattosio-

dipendente (Dumic, 2006) e la galectina-3 potrà essere ridistribuita nuovamente sulle placche di adesione (Baptiste, 2007).

Le innumerevoli funzioni intra- ed extracellulari della galectina-3 sono riassunte nelle seguenti figure.

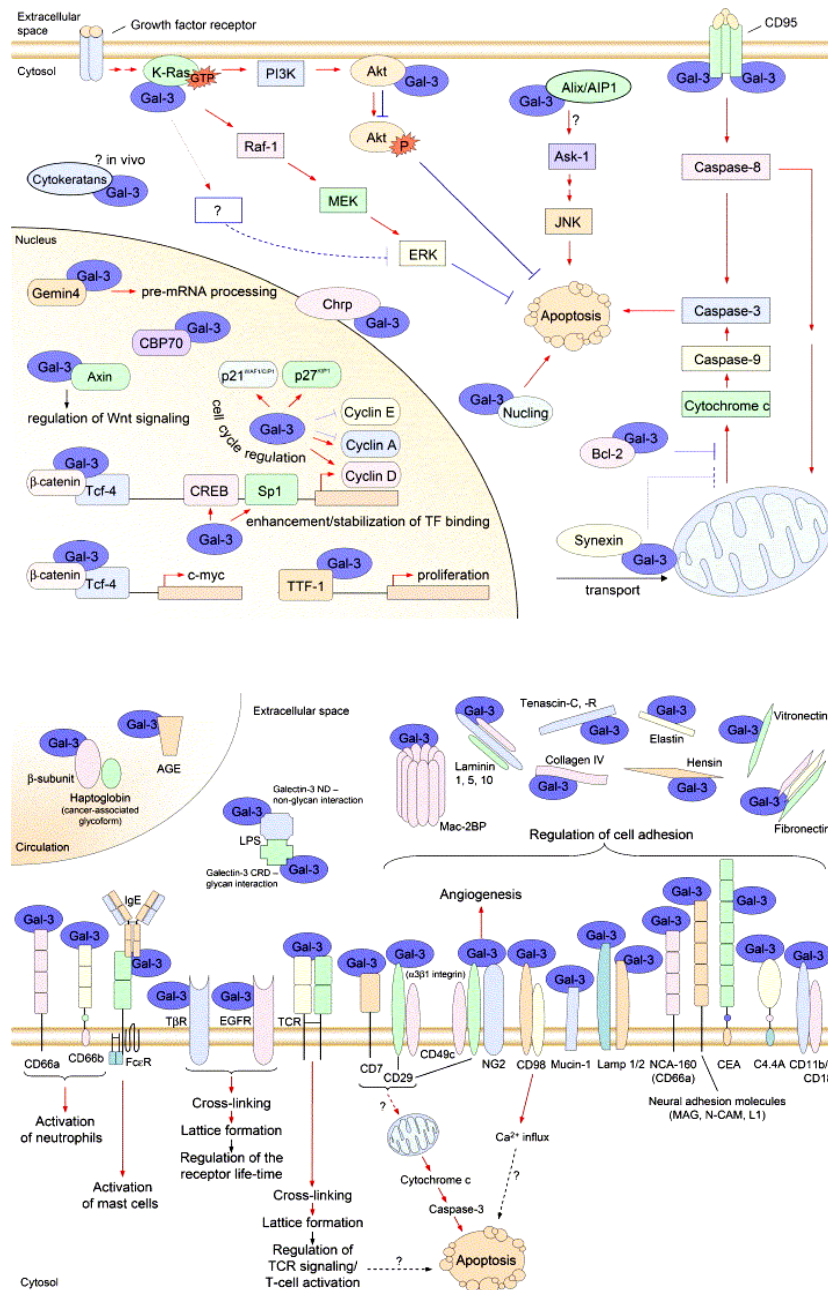


Figura III.2. Funzioni della galectina-3. Rappresentazione degli innumerevoli ruoli svolti dalla galectina-3 (Gal-3), sopra, a livello intracellulare; sotto, a livello extracellulare.

I numerosi ligandi intracellulari della galectina-3 ne fanno una molecola in grado di regolare proliferazione, differenziazione, sopravvivenza e morte cellulare. E' da notare come le

interazioni tra galectina-3 e molecole intracellulari siano il più delle volte, interazioni di tipo proteina-proteina piuttosto che di tipo lectina-glicocongiugato (Krześlac, 2004) eccezion fatta per il legame con le citocheratine. Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato la formazione di un legame tra la galectina-3 e le citocheratine tramite un residuo GalNac terminale (Krześlac, 2004).

Ultime ricerche evidenziano un ruolo della proteina non solo a livello citosolico, ma anche a livello nucleare. Gli esatti meccanismi di ingresso della galectina-3 a livello del nucleo non sono ancora del tutto chiari; ma probabilmente è coinvolto nel trasporto del complesso SMN (*Survival of Motor Neuron*) implicato nell'assemblamento dello "spliceosoma". (Davidson, 2002).

La galectina-3 extracellulare svolge numerosi effetti autocrini e paracrini: media l'adesione e l'attivazione cellulare ed agisce da chemo-attrattore per alcune cellule, influenzando il mantenimento dell'omeostasi cellulare, le reazioni immuni, l'organogenesi, l'angiogenesi, l'invasione tumorale e la metastatizzazione; fenomeno, quest'ultimo, in cui risulta coinvolta anche l'interazione della galectina-3 con l'antigene di superficie Tf, noto per essere espresso da cellule altamente metastatizzanti (Glinskii, 2003; Shekhar, 2004; Infusa, 2001; Zhu, 2001; Moiseeva, 2005; Baptiste, 2007; Khaldoyanidi, 2003).

Coinvolgimento in Patologie Osteoarticolari

Alla galectina-3 sono attribuite diverse funzioni biologiche; essa è implicata nella regolazione di eventi cellulari quali apoptosi, infiammazione, adesione cellulare, angiogenesi, *splicing* pre-mRNA e modulazioni di patologie autoimmuni. Essa risulta avere un ruolo chiave nello sviluppo di numerose patologie neoplastiche (Inohara, 1999; Elad-Sfadia, 2004; Puglisi, 2004; Khaldoyanidi, 2003; Berberat, 2001; Huflejt, 1997; Greco, 2004; Yu, 2007; Shekhar, 2004; Inususa, 2001; Zou, 2005; Debray, 2004; John, 2003; Moon, 2001; Paron, 2003) ed autoimmuni (Ohshima, 2003; Jensen-Jarolim, 2001; Lim, 2002; Neidhart, 2005).

L'aumentata espressione della galectina-3 risulta essere un fattore rilevante per lo sviluppo di patologie artritiche poiché induce un incremento dei livelli di metalloproteasi, come MMP3 e ADAMTS-5, disgreganti la cartilagine (Janelle-Montcalm, 2007). Da ciò si può dedurre l'importanza dello studio della correlazione di tale proteina alle diverse patologie artritiche. In particolare, sembra che la distribuzione della galectina-3 vari a seconda della tipologia di artrite. Infatti, si è dimostrato che essa si trova accumulata in tutta la membrana sinoviale e nei punti di disgregazione della cartilagine e dell'osso di pazienti affetti da artrite reumatoide.

Analisi effettuate su cellule sinoviali da pazienti osteoartritici, reumatici e sani, mantenute in coltura, hanno evidenziato come nel caso delle cellule da paziente reumatico la galectina-3 sia altamente localizzata a livello intracellulare, e non sulla superficie (Ohshima, 2003); inoltre, il paziente reumatico mostra un accumulo della stessa proteina anche nel fluido sinoviale e nel siero. Al contrario, la stessa tipologia di campioni prelevati da pazienti con osteoartrite hanno mostrato livelli di galectina-3 paragonabili a campioni di pazienti sani (Ohshima, 2003). Inoltre, si è notato come coltivando in vitro i fibroblasti sinoviali derivanti da pazienti con artrite reumatoide ci fosse un aumento della concentrazione di galectina-3 nel medium di coltura, pur senza riscontrare un incremento della sintesi proteica totale (Ohshima, 2003). Altri studi dimostrano come queste cellule presentino un' aumentata adesione alla matrice cartilaginea e un incremento del contenuto intracellulari della galectina-3 rispetto ai fibroblasti sinoviali derivanti da pazienti osteoartritici (Neidhart, 2005).

Tuttavia, il paziente osteoartritico presenta un aumentato livello di galectina-3 liberata da macrofagi nel sito di infiammazione (Janelle-Montcalm, 2007) e sulla superficie di condrociti prelevati e mantenuti in coltura (Guévremont, 2004).

E' inoltre interessante notare come in alcuni testi la galectina-3 venga chiamata AGE-R3. Tale nome deriva dal fatto che essa risulta essere un recettore per gli *Advanced Glycation Endproducts*. Il loro legame con la galectina-3 avviene in modo specifico e saturabile. Ne consegue l'endocitosi e successiva degradazione lisosomiale (Krześlak, 2004).

Il complesso AGE-galectina-3 contribuisce allo sviluppo di patologie infiammatorie croniche correlate a diabete e invecchiamento, tra cui anche le patologie artritiche. Si è evidenziato inoltre come l'esposizione agli AGE aumenti l'espressione di galectina-3 negli osteoblasti, e ne riduca la secrezione, suggerendo quindi un ruolo significativo degli AGE nella modulazione del metabolismo degli osteoblasti e nel turnover osseo (Mercer, 2004).

IV. Metodi Diagnostici: l'Imaging Molecolare

Negli ultimi 25 anni la diagnosi di patologie tramite l'utilizzo dell'*imaging* diagnostico è notevolmente cambiata e maturata.

Lo sviluppo della risonanza magnetica (MRI), della tomografia computerizzata (CT) e della ultrasonografia hanno permesso la visualizzazione di differenti tessuti rispetto alla radiografia convenzionale. Molte proprietà individuali dei tessuti nell'ambito dell'MRI, come la densità protonica, le velocità di rilassamento, il flusso, lo shift chimico, la diffusione e la perfusione, contribuiscono al contrasto del tessuto molle. La tomografia computerizzata (CT) e

l'ultrasonografia (US) si basano invece su una singola caratteristica, rispettivamente la densità e la riflessione del suono.

Inizialmente l'MRI era una tecnica particolarmente costosa che richiedeva tempi lunghi di analisi; essa forniva immagini esclusivamente del cervello e non appariva possibile il suo impiego per porzioni del corpo in cui vi fosse un significativo movimento, come ad esempio il cuore. Tuttavia, tramite l'utilizzo di differenti tecniche, si possono ottenere informazioni morfologiche e persino funzionali. Ora, grazie alle rapide sequenze di immagini e alle innovazioni tecnologiche, immagini MRI altamente risolte del cuore pulsante permettono l'analisi dettagliata della motilità della parete cardiaca e della perfusioni in pazienti presentanti ischemia e infarto (Tempany, 2001).

Oltre agli sviluppi delle apparecchiature utilizzate per le immagini diagnostiche, un ulteriore miglioramento delle tecniche per immagini è rappresentato dall'*imaging* molecolare. Esso può essere definito come la caratterizzazione e misurazione *in vivo* di processi biologici a livello cellulare e molecolare. Il crescente interesse per questa modalità di immagine risiede nella sua capacità di fornire informazioni molecolari e metaboliche, che spesso risultano di maggiore utilità diagnostica rispetto alle semplici informazioni anatomiche (Hoffman, 2007).

Il termine "*imaging* molecolare" è entrato in uso negli anni novanta, benché già l'utilizzo della medicina nucleare per rilevare patologie tiroidee può essere considerata un sistema diagnostico di tipo molecolare. Nel corso degli anni l'importanza dello sviluppo di tale strategia diagnostica è incrementata al punto che attualmente vi sono due società che si occupano dell'*imaging* molecolare (la *Society for Molecular Imaging* e l'*Academy of Molecular Imaging*), ciascuna delle quali possiede una propria rivista rivolta all'*imaging* molecolare (*Molecular Imaging*, e *Molecular Imaging and Biology*). Altre riviste dedicate alla diagnostica per immagine hanno cambiato il loro nome per introdurre l'aspetto molecolare (i.e. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *Journal of Molecular Imaging-Advancing Molecular Imaging*) (Hoffman, 2007).

Diverse strumentazioni possono essere utilizzate per l'*imaging* molecolare: PET, MRI e l'*imaging* ottico (Tempany, 2001).

L'utilizzo di mezzi di contrasto in MRI e CT ha incrementato l'accuratezza delle diagnosi, tuttavia vi è la necessità di ottenere informazioni molecolari e biochimiche. Per questo si rende necessario sviluppare mezzi di contrasto che siano così detti "*smart probes*" (sonde intelligenti), agenti in grado non solo di incrementare il contrasto in generale, ma anche di localizzarsi in modo specifico in determinati siti o di subire alterazioni *in vivo* che permettano la loro visualizzazione solo quando si trovino localizzati in tessuti specifici o qualora sia

presente una determinata patologia; ottenendo in tal modo un'immagine molecolare. Uno dei primi utilizzi dell'*imaging* molecolare è rappresentato dall'utilizzo in PET (tomografia ad emissione di positroni) dell'FDG ([¹⁸F]fluoro-2-desossi-D-glucosio). L'FDG entra all'interno della cellula attraverso i trasportatori di glucosio e viene fosforilata a FDG-6-fosfato da parte dell'enzima esochinasi, enzima significativamente sovra-espresso nelle patologie tumorali. L'FDG-6-fosfato, essendo carico negativamente, resta intrappolato all'interno della cellula permettendo dunque di visualizzare le zone che presentino una sovra espressione di tale enzima (Hoffman, 2007).

L'*imaging* ottico utilizza la fluorescenza nel vicino infrarosso, che permette la visualizzazione *in vivo* delle attività enzimatiche, come quella della catepsina D, enzima che risulta anch'esso sovra-espressa in molti tumori (Tempany, 2001).

Nel futuro della diagnostica, l'*imaging* molecolare permetterà il miglioramento della caratterizzazione e della fenotipizzazione delle patologie sulla base di informazioni biologiche e biochimiche da accompagnarsi a quelle di natura anatomica.

Inoltre, l'*imaging* molecolare può essere utilizzato anche a fini terapeutici. Lo scopo finale dei trattamenti terapeutici, consiste nell'identificazione dell'obiettivo del trattamento e la somministrazione della massima dose terapeutica sullo specifico obiettivo, distinguendo la zona da trattare dal tessuto sano circostante. Sistemi MRI sono utili per guidare il trattamento ed il *follow-up* degli effetti di chirurgie cerebrali e al midollo spinale, come anche per seguire il decorso di crioblazioni di tumori epatici e carcinomi mammari (Tempany, 2001).

Vista la complessità dell'artrite reumatoide, spesso risulta difficile distinguerla da altre patologie osteoarticolari, per questo la messa a punto di metodologie in grado di fornire una diagnosi precoce e precisa è uno dei passi fondamentali nella lotta all'artrite reumatoide. Oggi sono disponibili test di tipo immunologico a livello sierico e tecniche di *imaging* in grado di dare alcune informazioni importanti sulla natura e sul decorso della malattia.

Analisi del sangue

La più comune diagnosi consiste nella ricerca del fattore reumatoide (FR). Come già detto, si tratta di un anticorpo contro la porzione Fc dell'IgG. Da questa interazione si forma un immunocomplesso che contribuisce alla malattia.

Il 70-80% dei pazienti affetti da artrite reumatoide risulta presentare elevati livelli circolanti di fattore reumatoide (Golbach-Minsky, 2000).

Essendo la diagnosi di artrite reumatoide prettamente clinica, un risultato negativo non esclude la presenza dell'artrite reumatoide, ed in tal caso il processo si definisce di tipo "sieronegativo". Durante il primo anno dall'insorgenza della malattia il FR risulta zero in quasi l'80% dei pazienti che poi evolvono verso lo stato di sieropositivo. Altre malattie sono caratterizzate dalla presenza in quasi il 100% dei casi di fattore reumatoide, quali la sindrome di Sjögren o la crioglobulinemia mista. In molte condizioni la presenza del FR rappresenta un "falso positivo" (vedasi ad esempio infezioni virali croniche, patologie oncoematologiche, ecc.), perciò il test non risulta molto specifico, ma in combinazione con altri segni e sintomi può avere valore diagnostico e prognostico. Più sono alti i livelli di RF, maggiore è la possibilità di una malattia articolare distruttiva (van Boekel, 2002).

Un'altro marcatore immunologico sierico dotato di maggiore specificità è rappresentato dagli anticorpi anti-citrullina (ACPA). La citrullinazione (conversione di peptidil-arginina in peptidil-citrullina) induce la formazione di un nuovo sistema auto-anticorpale.

Utilizzando peptidi ciclici con citrullina (CCP, *Cyclic Citrullinated Peptide*) come antigeni, sono stati individuati anticorpi diretti contro tali antigeni specificatamente in pazienti con artrite reumatoide. In tal modo vengono individuati circa l'80% dei pazienti affetti da artrite reumatoide, ma con una percentuale molto più bassa di falsi-positivi rispetto al fattore reumatoide (specificità 98%). Gli anticorpi anti-ACP possono essere individuati anche nei primi stadi della malattia. Il più comune di questi test è il test per l'anti-CCP (Zendman, 2006). Anticorpi anti-CCP e fattori reumatoidi (in particolare IgA) hanno mostrato di poter predire lo sviluppo della patologia artritica con diversi anni di anticipo. Modificazioni post-traslazionali costituiscono dunque i primi processi nello sviluppo della patologia (Rantapaa-Dahlqvist, 2003).

Altri autoanticorpi, come AKA (anticorpo anticheratina), APF (fattore antiperinucleare), AFA (anticorpo antifilagrina), e anti-Sa (anticorpo anti-vimentina citrullinata) (El-Gabalawy, 2004; van Boekel, 2002; Wipke, 2004; Shou, 2006), prima delle messe a punto delle attuali analisi in ELISA degli ACPA si erano già dimostrati essere correlati con la presenza di artrite reumatoide e mostrano una specificità superiore rispetto al fattore reumatoide. AKA, APF e AFA identificano epitopi presenti sulla cheratina, profilaggrina e filaggrina rispettivamente. Queste proteine subiscono una modificazione post-traslazionale che implica la de-iminazione dell'arginina a citrullina. In questo modo si hanno epitopi che vengono riconosciuti dal siero

di pazienti affetti da artrite reumatoide. Resta sconosciuto lo stadio a cui si ha un incremento dei singoli anticorpi (Goldbach-Minsky, 2000).

Di seguito si riporta in una tabella riassuntiva il valore diagnostico di ciascun autoanticorpo nello sviluppo dell'artrite reumatoide (Goldbach-Minsky, 2000).

Tabella IV.1.

Diagnostic value of individual autoantibodies for rheumatoid arthritis					
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
RF	0.66	0.87	0.80	0.76	0.78
AFA	0.33	0.93	0.79	0.63	0.66
Anti-Sa	0.22	0.98	0.88	0.61	0.64
Anti-CCP	0.41	0.91	0.78	0.66	0.69
AKA	0.26	0.84	0.56	0.58	0.58
RF+ and one or more*	0.50	0.96	0.90	0.70	0.75
RF- and one or more*	0.31	0.73	0.26	0.77	0.63

* Includes antiphospholipase A2 antibody (AFA), anti-Sa, cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) and antikeratin antibody (AKA). PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; RF, rheumatoid factor.

Imaging

Le tecniche di diagnostica per immagini più usate nel caso dell'artrite reumatoide sono la risonanza magnetica (MRI) e l'*Optical Imaging*.

La risonanza magnetica permette l'individuazione precoce di modifiche alle ossa e al tessuto molle nell'artrite reumatoide; attualmente è considerato il mezzo d'elezione per la valutazione di questa patologia (Burstein, 2003).

Questa tecnica consente infatti la visualizzazione dei sinoviociti con alta sensibilità grazie all'utilizzo di sonde a base di gadolinio che permettono anche la distinzione tra l'infiammazione del tessuto molle ed i versamenti articolari (Biswal, 2007).

L'*Optical Imaging* viene utilizzato negli studi preclinici sugli animali, ma già si stanno sviluppando le metodologie per applicare tale tecnica anche all'uomo.

Questa tecnica si avvale dell'utilizzo di particolari sonde fluorescenti che possono essere rilevate a basse concentrazioni e radiazioni non ionizzanti, sicure per l'individuo. Sonde per *Optical Imaging* sono state inoltre coniugate a piccole molecole, anticorpi e proteine per una

maggior specificità. Lo sviluppo di questa tecnica è stato fortemente incentivato dai nuovi strumenti ottici messi a punto negli ultimi decenni, che hanno contribuito ad aumentare il numero di applicazioni dell'*Optical Imaging* in diagnostica. Questa tecnica, rispetto ad altre più consolidate, presenta l'indubbio vantaggio di essere poco costosa e di usare strumenti di ridotte dimensioni, risultando dunque particolarmente versatile.

La diagnostica per immagini svolge un ruolo importante per la valutazione di patologie articolari; la sfida maggiore per questo tipo di patologie consiste nell'essere in grado di rilevare i primi responsabili del dolore o dell'infiammazione. Ad esempio, un dolore al ginocchio viene comunemente analizzato per individuare se l'origine di tale dolore sia di tipo traumatico, artritico, metabolico, infettivo, neoplastico o infiammatorio (Biswal, 2007).

Le convenzionali metodologie di indagine diagnostica per immagine risultano strumenti deboli per l'immagine di patologie croniche, in particolare risulta difficile la distinzione tra stadio acuto e cronico e l'identificazione di fasi iperacute (Biswal, 2007). E' in questo mare di incertezza che l'*imaging* molecolare può fornire informazioni utili sempre utilizzando gli stessi strumenti per immagine attualmente in uso.

Inoltre, l'utilizzo di tecniche di *imaging* funzionale e molecolare assieme a strumenti di immagini anatomiche, può indubbiamente incrementare la specificità e la sensibilità della diagnosi. Le procedure di immagine molecolare dovrebbero essere considerate importanti strumenti complementari alle tecniche di indagine per immagini utilizzate in clinica.

Nuovi mezzi di contrasto per MRI potranno incrementare il potenziale di questa tecnica. Inoltre, l'emergere di nuove tecniche di immagine che utilizzano metodi ottici (fluorescenza e bioluminescenza), che sono attualmente di comune utilizzo in modelli animali preclinici, sono in corso di sviluppo per la loro applicazione anche sull'uomo (Biswal, 2007).

Nella moderna era della medicina molecolare, terapie geniche e terapie cellulari potranno essere studiate direttamente e indirettamente tramite l'uso dell' *imaging* molecolare.

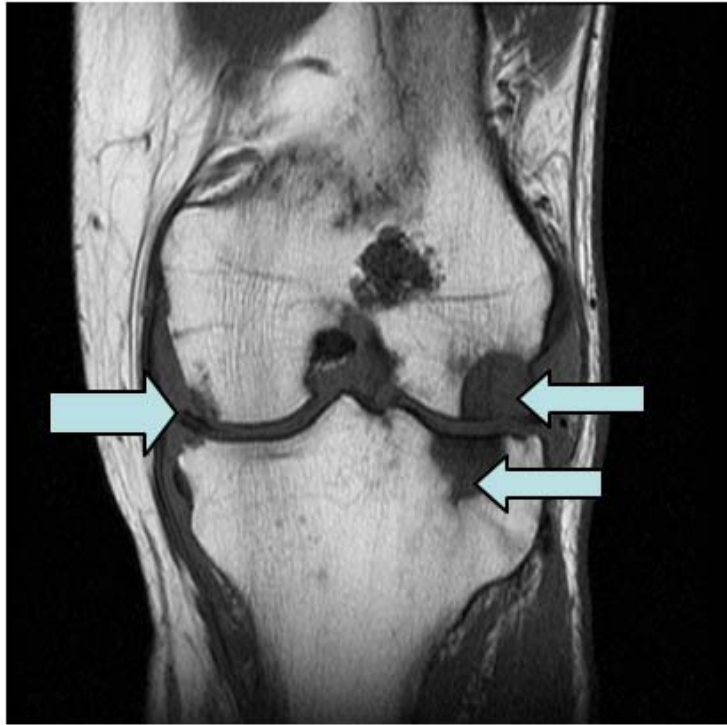


Figura IV.1. Ginocchio di paziente affetto da artrite reumatoide. Le frecce evidenziano il *pannus* tipico dell'artrite reumatoide.

PARTE A

ANALISI DELLE PATOLOGIE ARTICOLARI A LIVELLO MOLECOLARE:

**Determinazione delle Interazioni tra Biopolimeri
Modificati e Componenti Molecolari e Cellulari di Strutture
Cartilaginee**

CAPITOLO 1

CLUSTERIZZAZIONE DI UNITA' GALATTOSIDICHE

1.1 INTRODUZIONE: SUPPORTI PER LA CLUSTERIZZAZIONE DEL GALATTOSIO

La strategia scelta per la preparazione di un costrutto in grado di interagire selettivamente con le galectine è stata quella della *clusterizzazione* di molecole oligosaccaridiche su supporti di tipo polimerico e dendrimerico.

La scelta di questo approccio, già ampiamente usato nei nostri laboratori, è dovuto al fatto che le interazioni carboidrati-lectine sono insolitamente deboli e relativamente poco specifiche (la K_D è nell'ordine del mM rispetto alla concentrazione di monosaccaride), se confrontate con altri tipi di interazioni presenti in natura. Ciò è in larga misura dovuto alla natura del sito di legame delle lectine, poco profondo ed esposto al solvente, che consente poche interazioni dirette con il substrato. Questa marcata differenza di affinità mostrata dai siti di binding superficiali rispetto a quelli più profondi (tasche idrofobiche) è ben illustrata dal caso dell'emoagglutinina del virus dell'influenza, una lectina che lega l'acido sialico con un'affinità circa 1000 volte inferiore a quella di una neuroaminidasi trovata nello stesso virus. Accade però che, quando più zuccheri del giusto tipo e con la corretta orientazione si trovino *clusterizzati* insieme, si verifica un rapido incremento sia dell'affinità che della specificità della lectina verso quel determinato zucchero. Tale aumento è maggiore di quanto atteso per il solo incremento della concentrazione locale (effetto statistico) dell'oligosaccaride, ed è noto con il nome di "effetto cluster" o "effetto multivalente" (Davis, 1999).

Non vi è ancora una spiegazione esauriente sulle modalità dell'effetto cluster, ma le sue implicazioni biologiche sono profonde, poiché esso si riflette per esempio sulla cinetica dell'interazione, rendendola spesso più veloce. Inoltre, molte attività inibitorie dimostrate da zuccheri clusterizzati non si verificano in presenza dello stesso oligosaccaride in forma non coniugata.

La natura dispone di array multivalenti di carboidrati sulla superficie delle cellule sia grazie alla presenza delle strutture ramificate degli oligosaccaridi delle glicoproteine, sia a causa

dello scivolamento dei glicolipidi all'interno del doppio strato lipidico, fenomeno che dà luogo alla formazione di zone ad elevata densità locale di carboidrati.

Da un punto di vista sintetico, invece, la preparazione di glicoconiugati a base polimerica (peptidi, polisaccaridi o polimeri sintetici) e dendrimerica (figura 1.1) risponde perfettamente alla necessità di clusterizzare strutture saccaridiche su un supporto macromolecolare. Alcuni vantaggi collaterali di questo approccio sono la maggior resistenza degli zuccheri legati nei confronti dell'attività idrolitica di molti enzimi e la diminuzione dello stress osmotico rispetto all'introduzione della stessa concentrazione di carboidrati in forma libera (Lee, 2000).

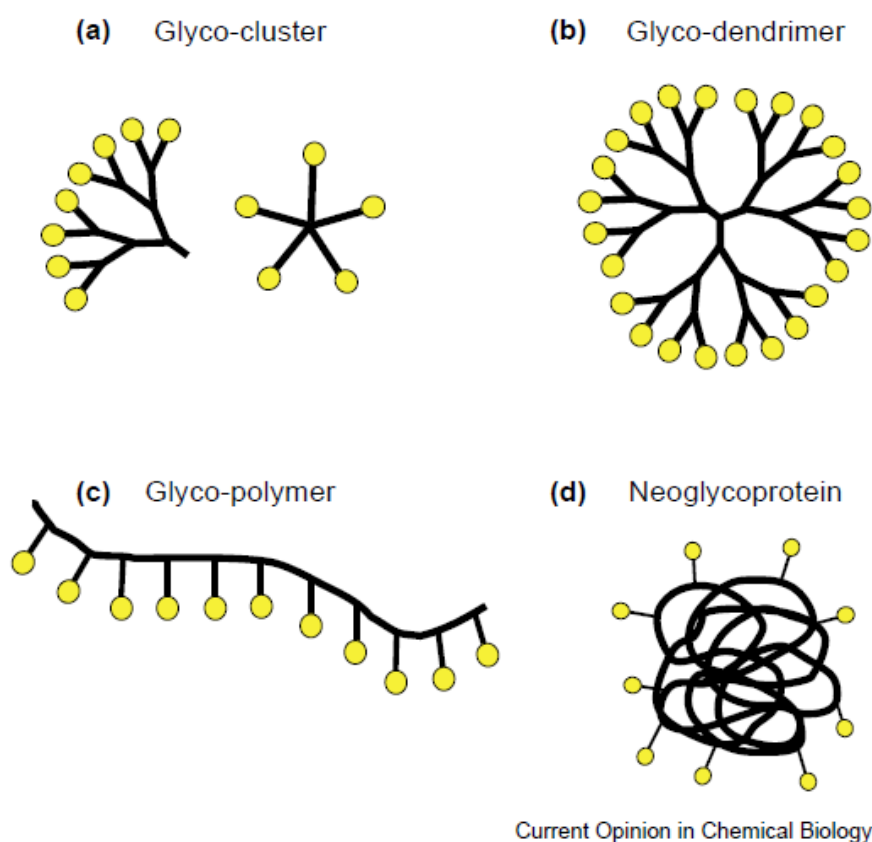


Figura 1.1. Rappresentazioni di possibili forme di clusterizzazione di unità saccaridiche. (a) clusterizzazione di unità galattosidiche su piccola scala, (b) dendrimeri che espongono un'elevata densità di unità glicosidiche con distribuzione simmetrica, (c) carrier polimerici, (d) neoglicoproteine: glicoproteine coniugate sinteticamente con catene glicaniche.

Per questo motivo risulta chiaro il vantaggio di preparare glicoconiugati “decorati” con β -galattosio per aumentare l'interazione con le galectine, specialmente per gli esperimenti *in vivo*, in cui le galectine sono in grado di riorganizzarsi.

A tal fine sono stati presi in considerazione tre “supporti” di natura macromolecolare significativamente diversi tra loro: due polisaccaridi, il chitosano ed il destrano e il dendrimero PAMAM.

1.1.1 Chitosano e Chitlac

Il primo polimero preso in esame come carrier di unità di β -galattosio è stato il Chitlac, un derivato del chitosano ottenuto per amminazione riduttiva delle ammine primarie del polimero con il lattosio (Donati, 2005) secondo una procedura già riportata in letteratura (Yalpani, 1984).

Il chitosano è un polimero lineare con un peso molecolare variabile tra i 50 e i 1000 kDa ottenuto attraverso la deacetilazione alcalina del polisaccaride naturale chitina. La chitina, la cui unità ripetitiva è costituita da monomeri di N-acetilglucosammina concatenati con legame β 1-4, è la costituente principale dell'esoscheletro di molti crostacei e svolge funzioni strutturali anche in alcuni insetti e nella parete cellulare dei funghi. Il chitosano, oltre che per trattamento chimico della chitina, è ottenibile anche da alcuni microrganismi (Crescenzi, 1994). Chitina e chitosano sono gli unici polisaccaridi naturali a larga diffusione con carica positiva. A seconda dell'origine e del processo di deacetilazione usato, il chitosano mantiene un grado di acetilazione residuo, solitamente compreso tra il 25 e il 10%.

Questo polimero è stato largamente usato in medicina grazie alle sue caratteristiche di adesività, biocompatibilità e biodegradabilità. Il chitosano usato in modelli di trapianto non ha mostrato né risposte infiammatorie patologiche né ha dato luogo a infezioni o alla presenza di endotossine e l'incidenza di risposta immunologica specifica è bassissima se non nulla. Negli ultimi anni la carica positiva del chitosano ha trovato un'interessante applicazione nella veicolazione di sequenze di DNA all'interno della cellula per le strategie di *gene delivery* (Mansouri, 2006; Köping-Höggård, 2001; Park, 2006; Huang, 2002; Murata, 1997; Shikata, 2002; Ma, 2003; Gao, 2003; MacLaughlin, 1998; Cook, 2005; Kim, 2004).

L'elevata densità di cariche positive sul chitosano, dovute alla presenza di ammine primarie, costituisce anche un limite di questo polimero, rendendolo poco solubile a pH alcalini. Una strategia per aumentarne la solubilità consiste nel deacetilare esaustivamente la chitina e di reintrodurre per via chimica una piccola percentuale di gruppi N-acetamido sul polimero così ottenuto. In questo modo i gruppi acetile si trovano distribuiti in modo casuale lungo la catena, e l'assenza di ordine favorisce la solubilizzazione in acqua. Un'altra strategia consiste nell'introdurre lungo la catena gruppi polari che aumentino l'idrofilicità del polimero.

Ulteriori modifiche del chitosano includono l'acilazione (Kubota, 2000; Sorlier, 2001), l'alchilazione (Sashiwa, 1999; Yang, 2002), la carbossimetilazione (Muzzarelli, 1982), e la quaternarizzazione (Murata, 1996).

All'interno di questo approccio, il legame con unità saccaridiche è di grande interesse, perché permette di ancorare alla catena polimerica molecole che, oltre ad essere molto idrofiliche, sono importanti segnali cellulari.

Dal punto di vista chimico, le ammine primarie ottenute attraverso la deacetilazione, costituiscono dei gruppi reattivi che, attraverso la reazione di amminazione riduttiva, permettono l'ancoraggio di mono- e oligosaccaridi alla catena polimerica. Nei nostri laboratori, negli ultimi anni è stato sintetizzato e caratterizzato un derivato del chitosano modificato con molecole di lattosio. A questo composto è stato dato il nome "Chitlac".

Il procedimento sintetico seguito per la sua sintesi è basato sulla procedura riportata da Yalpani (Yalpani, 1984).

La Figura 1.2. riporta schematicamente la struttura del Chitlac.

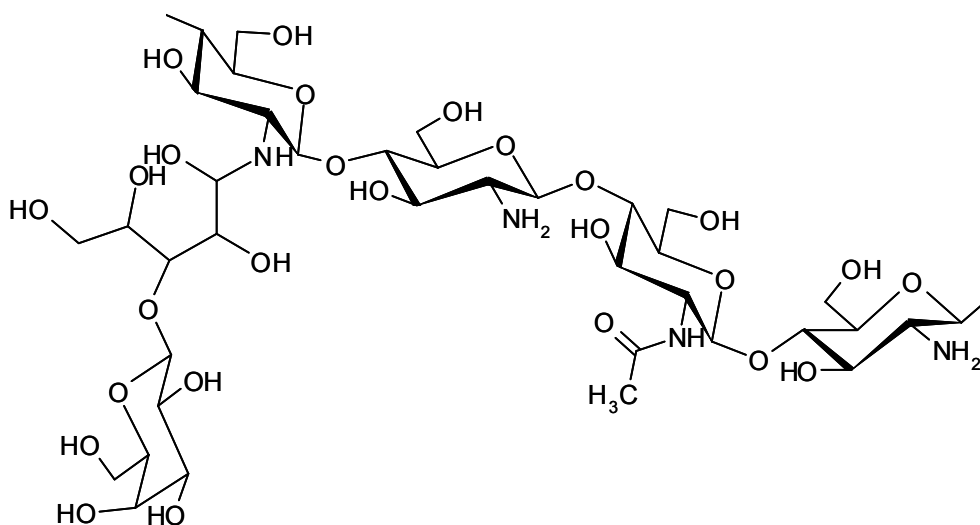


Figura 1.2. Rappresentazione schematica del Chitlac

Il meccanismo della reazione prevede la formazione di una base di Schiff tra il gruppo amminico del polimero e il gruppo aldeidico presente nella forma aperta dell'estremità riducente del lattosio. Questo intermedio non è stabile, tuttavia la presenza dell'anione cianoboroidruro porta alla sua riduzione ottenendo un gruppo amminico secondario (Lane, 1975).

Il Chitlac presenta alcuni importanti vantaggi rispetto al chitosano: risulta infatti solubile a pH fisiologico per la presenza delle catene laterali di lattosio altamente idrofiliche e per la riduzione dei gruppi NH_2 della glucosammina. Un'altra proprietà importante del Chitlac è quella di essere miscibile con altri polisaccaridi anionici come ad esempio l'alginato; la bassa carica residua delle catene laterali del Chitlac, consente infatti di ottenere una miscela di questi due polielettroliti di carica opposta, senza che si verifichi alcuna separazione di fase.

In precedenti studi condotti nei nostri laboratori (Donati, 2005), è stato evidenziato che il Chitlac induce aggregazione cellulare quando messo in contatto con colture primarie di condrociti di maiale, portando alla formazione di noduli di considerevoli dimensioni (fino a 0.5-1 mm di diametro). Il risultato dell'analisi dei noduli ha evidenziato che il chitosano modificato con il lattosio non è tossico e stimola la produzione di aggregano e di collagene di tipo II. Per questo motivo il Chitlac è un polimero di estremo interesse, non solo come trasportatore di sonde diagnostiche, ma anche per la sua intrinseca attività biologica.

In tutti gli esperimenti sono stati usati polimeri ottenuti da chitosano con grado di acetilazione del 15%.

1.1.2 Destrano

Il destrano è un polisaccaride ramificato la cui unità ripetitiva è rappresentata da glucosio legato prevalentemente con legame $\alpha(1-6)$ e $\alpha(1-4)$ in corrispondenza delle ramificazioni.

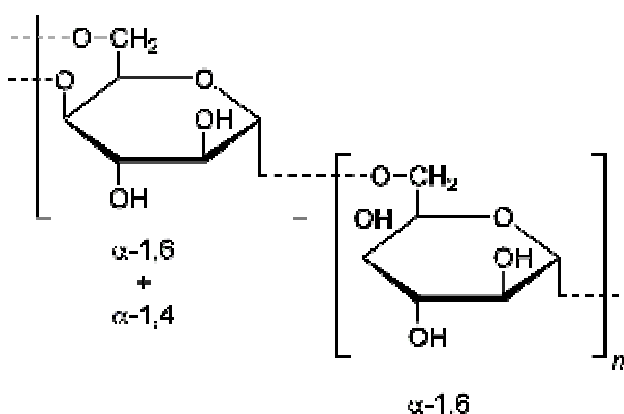


Figura 1.3. Rappresentazione schematica della struttura del destrano

Questo polimero ha trovato largo impiego in medicina: è stato dimostrato che una percentuale variabile tra il 25 e il 50% del destrano (PM 70'000) assunto dall'organismo viene eliminato

con le urine nel corso delle prime 24 ore dopo somministrazione endovenosa, mentre una piccola parte viene metabolizzata come carboidrati (Tarrow, 1953). Grazie all'elevato peso molecolare, viene spesso usato come anticoagulante, mentre la sua capacità di legare eritrociti, piastrine e l'endotelio vascolare, aumentandone l'elettronegatività e quindi riducendo l'aggregazione degli eritrociti e l'adesione delle piastrine, lo rende un potente agente antitrombotico. Infine, il destrano viene usato, per il suo potente effetto osmotico, nella terapia d'urgenza della ipovolemia.

Il destrano ha caratteristiche che lo rendono particolarmente interessante per la diagnostica: il coefficiente di diffusione interstiziale di destrani neutri è circa 10 volte maggiore di quello di proteine con lo stesso raggio idrodinamico (Nugent, 1984), probabilmente grazie alla grande idrofilicità e flessibilità di questo polimero, e all'assenza di carica lungo la catena (Vera, 2001). E' stata osservata anche la capacità dei destrani di "targettare" in modo passivo i tumori (Takakura, 1987; Tabata, 1997 e 1999): questo fenomeno è probabilmente dovuto ad una permeabilizzazione del sistema vascolare nei pressi di un tumore, che permette alle sostanze con le giuste dimensioni di accumularsi in un tessuto tumorale in misura significativamente maggiore rispetto ai tessuti sani (Jain, 1987). Anche se meno versatili dei gruppi amminici e carbossilici, gli ossidrilici presenti sul destrano possono essere modificati chimicamente, permettendo così l'introduzione di nuovi gruppi funzionali. Inoltre, il legame etero a cui danno luogo, è uno dei più stabili in natura.

1.1.3 PAMAM

La famiglia dei PAMAM (poliamidoammina) è la prima famiglia completa di dendrimeri ad essere stata sintetizzata, caratterizzata e commercializzata. Grazie alle loro proprietà così varie, queste molecole sono ormai riconosciute come una nuova classe di nano strutture sintetiche dalle caratteristiche uniche. I dendrimeri permettono un controllo estremamente preciso delle loro dimensioni e della forma e della posizione dei gruppi funzionali, tutte caratteristiche altamente desiderabili per molte applicazioni di tipo biomedico. Un'altra proprietà eccezionale dei dendrimeri è quella di essere degli ottimi mimetici delle proteine globulari. Infatti, sulla base delle loro dimensioni, del loro comportamento elettroforetico e di altre proprietà biomimetiche, essi sono noti anche come proteine sintetiche. All'interno della famiglia dei dendrimeri PAMAM, molti sono paragonabili per dimensioni e superficie a molte proteine importanti e ad altri costrutti biologici. Per esempio l'insulina ($\approx 30 \text{ \AA}$), il citocromo C ($\approx 40 \text{ \AA}$) e l'emoglobina ($\approx 55 \text{ \AA}$) hanno approssimativamente la stessa forma e

dimensioni delle generazioni 3, 4 e 5, rispettivamente, dei dendrimeri PAMAM con core d'ammonio (Esfand, 2001).

I dendrimeri PAMAM di generazione 5 e 6 hanno diametri che sono approssimativamente equivalenti a quello del doppio strato lipidico delle membrane delle cellule eucariote.

Una considerazione estremamente importante è che i dendrimeri PAMAM sono non-immunogenici e mostrano una bassa citotossicità nei confronti dei mammiferi, in particolare quando la loro superficie è sostituita con gruppi anionici o neutri (Esfand, 2001).

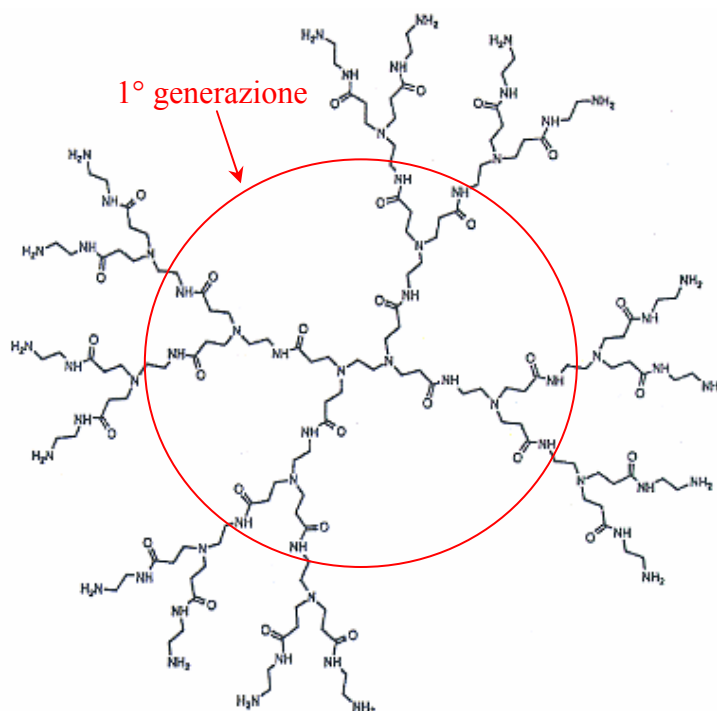


Figura 1.4. Struttura del PAMAM di 2° generazione.

1.2 MATERIALI E METODI:

Materiali

Acido cloroacetico, N³-(3-dimetilamminopropil)-N-etilcarbodiimide cloridrato (EDC), N-idrossi-succinimide (NHS), acido morfolinoetansolfonico (MES) e anidride succinica sono stati forniti da Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

Chitosano: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany);

- chitosano medium molecular weight (MMW): grado di acetilazione (DA), determinato mediante spettroscopia ¹H-NMR, pari al 20.5%. Il peso molecolare medio

viscosimetrico M_v è 565'000 g/mol ed è stato ottenuto da misure di viscosità intrinseca ($[\eta] = 5.5$ dL/g) (secondo l'equazione di Mark-Houwink);

- chitosano low molecular weight (LMW): grado di acetilazione pari al 13% e M_v pari a 230'000 g/mol ($[\eta] = 2.71$ dL/g);

Destrano, Fluka, MW: 70000 Da.

Dendrimero PAMAM: generazione 6 (PM 58'046.11), core di etilendiammina, di formula: $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]$, Sigma-Aldrich.

Membrane da dialisi: cutoff ~ 12'000 Da, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo).

Filtri a membrana: dimensione dei pori 8, 3, 1.2, 0.8, 0.45 e 0.2 μm , Millipore (Millipore, MA, USA).

Le misure di Dicroismo circolare sono state effettuate con uno spettropolarimetro Jasco-700A nell'intervallo di lunghezze d'onda tra 200 and 300 nm. Per i campioni è stata utilizzata una cella di quarzo dal cammino ottico di 1 cm. Gli spettri sono stati registrati in acqua e in tampone 10 mM Tris, 0.15 M NaClO_4 , pH 7.4.

I polimeri ottenuti sono stati caratterizzati con le tecniche classiche per l'analisi delle macromolecole. Il grado di carbossimetilazione dei destrani è stato valutato mediante titolazione potenziometrica con NaOH 0.1N. Lo strumento usato è un pHmetro Crison dotato di elettrodo a vetro. I polimeri sono stati dializzati contro acido cloridrico 0.1N, contro acqua bidistillata e quindi liofilizzati. I liofilati sono stati dissolti in NaCl 0.1N e le soluzioni sono state titolate con NaCl standard 0.1N.

Le misure di viscosità sono state effettuate con uno strumento Schott-Geräte AVS/G automatico, equipaggiato con un viscosimetro capillare a caduta libera di tipo Ubbelohde, dal diametro interno di 0.53 mm, termostato a 25 °C. La concentrazione polimerica iniziale è stata di 1.8 mg/mL per i campioni potenzialmente degradati, 1.5 mg/mL per il Chitlac ad alto DS e 1.0 mg/mL per il chitosano ed i Chitlac a basso DS, che hanno viscosità intrinseca più alta; come solvente è stata utilizzata una soluzione tampone acetato AcONa (0.25 M)/ AcOH (0.25 M) a pH 4.7. Le soluzioni polimeriche, ottenute solubilizzando dapprima i liofilati in sola acqua e poi unendovi altrettanto tampone a concentrazione doppia, sono state filtrate su filtri Millipore con diametro dei pori di 3.0 μm e successivamente di 0.45 μm . Le diluizioni sono state effettuate con solvente filtrato (0.45 μm).

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati acquisiti con uno strumento Bruker Avance III 600 MHz Ultra Shield Plus con Z-Gradient Multinuclear (from ^{31}P to ^{15}N) Inverse Probe (BBI-z) con tuning e matching automatici, in D_2O , senza presaturazione del solvente residuo al fine di non compromettere i valori degli integrali dei segnali nelle vicinanze. La temperatura è stata posta a 343 K (70 °C) affinché il segnale dell'acqua si trovi lontano dai protoni anomeric di interesse. Altri parametri sono: recycle delay pari a 5 secondi, 16384 punti, 16 scansioni, finestra spettrale di 12 ppm. La calibrazione viene effettuata attribuendo chemical shift = 2.0 ppm al segnale del metile dei gruppi acetammido.

1.2.1 Sintesi dei Derivati del Chitosano

1.2.1.1 Chitlac a Diversi Gradi di Sostituzione

Purificazione del chitosano

Il chitosano commerciale è stato purificato da una soluzione acquosa, acidificata a pH 3-4 con HCl 1 N ed a cui si aggiunge NaCl per favorire la solubilizzazione, mediante due riprecipitazioni successive con isopropanolo. La soluzione viene poi dializzata contro acqua deionizzata e filtrata su filtri con dimensione dei pori decrescente fino a 0.45 μm , quindi liofilizzata.

60 mg di chitosano purificato (Medium Molecular Weight) sono stati sciolti in 2.5 mL di tampone acetato 1% pH 4.5. A dissoluzione avvenuta sono stati aggiunti goccia a goccia 2.5 mL di metanolo.

Diversi equivalenti di D-(+)-lattosio monoidrato sono stati sciolti in 1.5 mL del tampone, e a parte, diverse quantità di sodio cianoboroidruro sono state sciolte nello stesso volume di metanolo. Queste ultime due soluzioni sono state riunite e la miscela è stata aggiunta lentamente alla soluzione contenete chitosano. La soluzione è stata mantenuta sotto agitazione per una notte, quindi dializzata dapprima contro NaCl 0.1 M quindi contro acqua bidistillata e infine liofilizzata. Il grado di sostituzione dei polimeri ottenuti è stato quantificato mediante spettroscopia NMR.

1.2.1.2 Chitlac a diverso Peso Molecolare

La medesima procedura è stata utilizzata per ottenere polimeri a peso molecolare inferiore utilizzando chitosano a basso peso molecolare purificato e caratterizzato mediante viscosimetria.

1.2.1 Sintesi del derivato del destrano: DexLac

Sintesi di Lattosilammina

360 mg di lattosio (1 mmol) sono stati sciolti in 0.5 mL di una soluzione 0.2 M di $\text{NH}_4(\text{HCO}_3)$ in ammoniaca a 42°C per 36 ore. Al termine della reazione l'ammoniaca è stata eliminata per evaporazione e il prodotto recuperato con una resa del 90% senza ulteriori purificazioni.

Sintesi di Destrano Carbossimetilato

73 mg di destrano (PM 10'000 Da) sono stati sciolti in 3.6 mL di una soluzione 4.0 N di NaOH in atmosfera di azoto. Dopo circa 30' sono stati aggiunti 15 equivalenti (639 mg) di acido cloroacetico. La soluzione è stata mantenuta a 60°C per 90' e quindi dializzata dapprima contro NaCl 0,1 N e quindi contro acqua bidistillata e infine liofilizzata.

Per determinare il grado di carbossimetilazione ottenuto, una frazione del campione è stata ridializzata contro HCl 0.1 N, liofilizzata, ripresa in una soluzione 0.1 N di NaCl e titolata contro NaOH.

Sintesi del DexLac

50 mg (0.137 mmol gruppi carbossilici) di destrano carbossimetilato al 53% sono stati sciolti in 6 mL di tampone MES 0.2 M a pH 6.5. In 1 mL dello stesso tampone si sciolgono 65.5 mg di EDC e 7.88 mg di NHS. Le due soluzioni vengono unite e dopo pochi minuti si aggiungono 5 equivalenti (235 mg) di lattosilammina. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione per una notte quindi dializzata contro acqua bi distillata e liofilizzata. La resa della reazione, verificata attraverso spettroscopia ^1H NMR è stata del 100%.

1.2.2 Sintesi del derivato del PAMAM: PAMAMLac

Si sciolgono 158 mg di lattosio (0.44 mmol) in 1.5 mL di acqua. A questa soluzione si aggiungono 0.00172 mmol di PAMAM (equivalente a 0.44 mmol di NH_2) in metanolo (2 mL di una soluzione commerciale soluzione 1.38 mM), 133 mg di sodio cianoboroidruo e si porta a pH 5 per aggiunta di acido acetico glaciale.

Si lascia reagire per una notte in un vial con tappo a vite a 55 °C. Al termine della reazione si dializza contro acqua (Molecular Weight Cut Off (MWCO) = 12'000) e successivamente si liofilizza.

1.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Chitlac a diverso grado di sostituzione

Per evidenziare come la variazione del grado di sostituzione (*Degree of Substitution*, DS) del chitosano possa influenzare le sue proprietà biologiche, sono stati preparati una serie di polimeri a diverso grado di lattosilazione. Tutti i polimeri ottenuti in questa parte del lavoro sono stati caratterizzati mediante spettroscopia NMR.

La figura 1.5 riporta gli spettri ^1H NMR di alcuni campioni a grado di lattosilazione crescente, registrati a 70°C . La scelta di questa temperatura è risultata importante al fine di poter integrare i segnali dei protoni anomeric senza la sovrapposizione del segnale dell'acqua residua (gli spettri sono stati registrati in D_2O). La posizione del segnale dell'acqua infatti, al contrario dei segnali del polimero, ha una forte dipendenza dalle temperatura ed a 70°C si pone in una posizione dove non interferisce con alcun altro picco.

In figura 1.5 sono evidenziati i segnali utilizzati per la determinazione del grado di sostituzione. In particolare, il segnale A (4.92 ppm) è dovuto al protone anomeric delle unità di glucosammina della catena a cui si è legata una molecola di lattosio.

Il picco B (4.85 ppm) corrisponde al protone anomeric delle unità di glucosammina lungo la catena di chitosano non funzionalizzate, mentre il segnale C (4.55 ppm) è attribuito al protone anomeric delle unità di N-acetilglucosammina.

Il picco D (4.5 ppm) corrisponde al segnale del protone anomeric del galattosio ancorato alla catena del chitosano; infine il singoletto a 2 ppm (picco E) corrisponde ai tre protoni del gruppo N-acetamido.

La larghezza intrinseca dei picchi dovuta all'alto peso molecolare del polimero causa sovrapposizioni tra i picchi C e D (e parziale sovrapposizione tra i picchi A e B). Tuttavia gli integrali dei segnali sono comunque ottenibili considerando il picco C come un terzo del picco E (riferendosi entrambi alla forma acetilata ed essendo E un metile). In linea di principio i due picchi si riferiscono a gruppi a mobilità diversa ed i loro integrali potrebbero non essere confrontabili. E' infatti presumibile che il metile (picco E) abbia una maggiore mobilità dell'anomeric (picco C). La differenza in mobilità, se presente, non porta a errori significativi nella stima del grado di sostituzione come dimostrato dalla buona correlazione che si ottiene dalla stechiometria dei reagenti e la stima da noi ottenuta con questo metodo. Tale correlazione è un dato significativo in quanto i prodotti sono stati dializzati e l'assenza di lattosio libero è stato controllata anche tramite spettroscopia DOSY dimostrando che il polimero è l'unica specie presente nella soluzione.

I gradi di acetilazione e di lattosilazione sono stati stimati confrontando rispettivamente la stima di C (anomerico prossimo all'acetile) e di D (anomerico del lattosio) con la somma degli anomerici della catena principale (A+B+C). L'integrale del picco D è ottenibile come differenza del volume globale che contiene C e D sottraendo la stima di C.

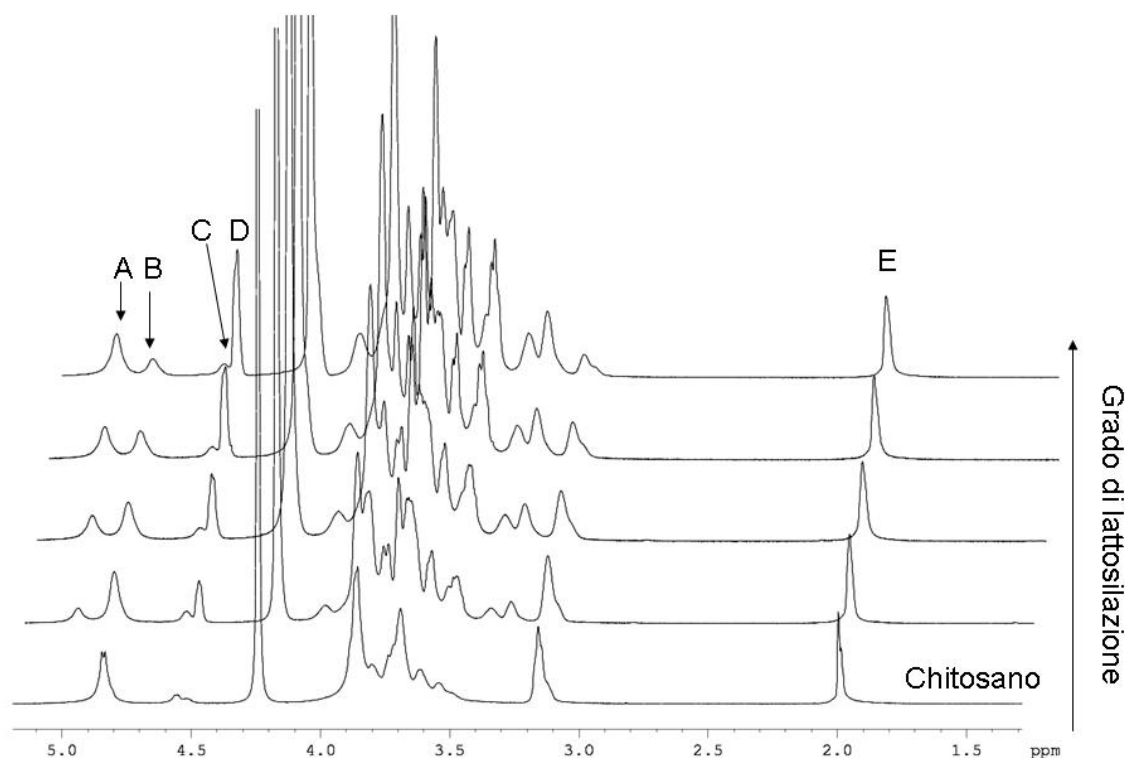


Figura 1.5. ¹H-NMR dei Chitlac a diverso grado di lattosilazione. Temperatura di registrazione: 70°C. Il picco E è stato sempre calibrato a 2ppm. Gli spettri sono rappresentati in leggera prospettiva per facilità di lettura.

La strategia sintetica già nota è stata ottimizzata in termini di numero di equivalenti di lattosio e di sodio cianoboridruo utilizzati. E' stato particolarmente importante minimizzare la quantità di riducente usato in quanto il sodio cianoboridruo è un prodotto tossico. Oggi sono disponibili diversi agenti riducenti più eco-compatibili di questo sale, ma, poiché da screening condotti preliminarmente esso è risultato il miglior riducente in acqua e in sistemi idroalcolici - condizioni queste necessarie per la funzionalizzazione dei polisaccaridi - si è preferito cercare di diminuire le quantità di riducente da usare, piuttosto che ricercare nuove specie riducenti.

I risultati ottenuti durante questa fase di ottimizzazione sono stati piuttosto interessanti: dalla figura 1.6 si nota che il grado di sostituzione dipende fortemente dal numero di equivalenti di

lattosio utilizzati, mentre risente in modo molto minore degli equivalenti di riducente. Si nota anche che le tre curve si scavalcano in corrispondenza di una determinata quantità di equivalenti di lattosio: a basse concentrazioni di lattosio si ottiene una sostituzione maggiore utilizzando un minor numero di equivalenti di NaCNBH_3 (curva verde), mentre l'andamento ha il comportamento atteso aumentando la quantità di lattosio utilizzato. Questo comportamento potrebbe essere spiegato ipotizzando che l'anione cianoboroidruro, quando presente in largo eccesso, salifichi le ammine del Chitlac, rendendole meno disponibili per la reazione di alchilazione.

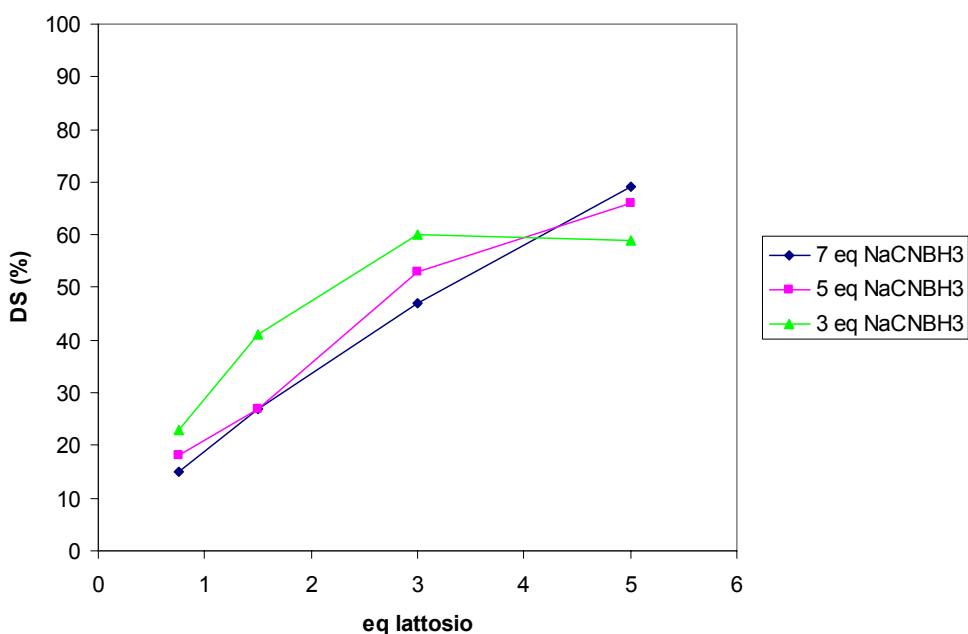


Figura 1.6. Andamento del grado di sostituzione ottenuto variando due parametri: equivalenti di lattosio e di sodio cianoboroidruro.

I prodotti così ottenuti sono stati caratterizzati in termini di viscosità intrinseca (figura 1.7) e di solubilità a pH 7.4 (figura 1.8), due dati estremamente importanti per poter valutare quali campioni sono più idonei ad essere testati per la attività biologica.

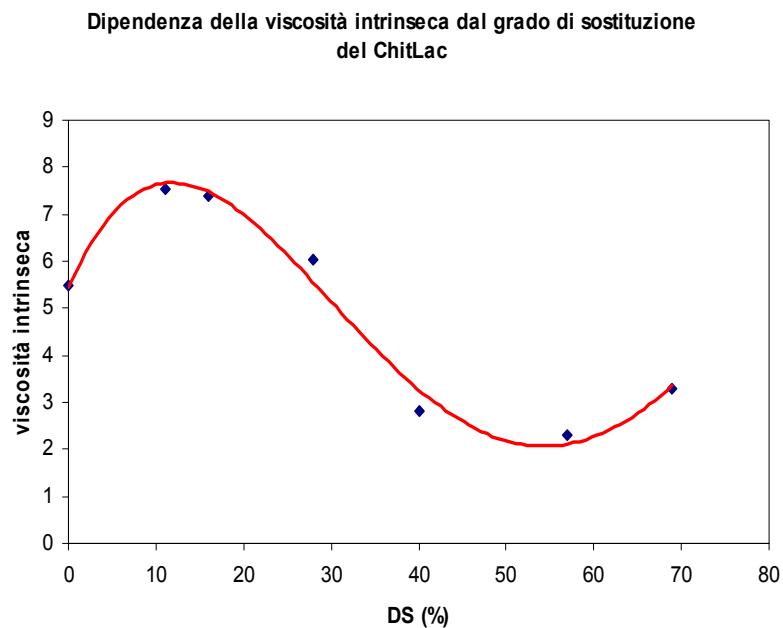


Figura 1.7. Andamento della viscosità intrinseca in funzione del grado di sostituzione del chitosano. Le condizioni di analisi sono riportate nella sezione Materiali e Metodi.

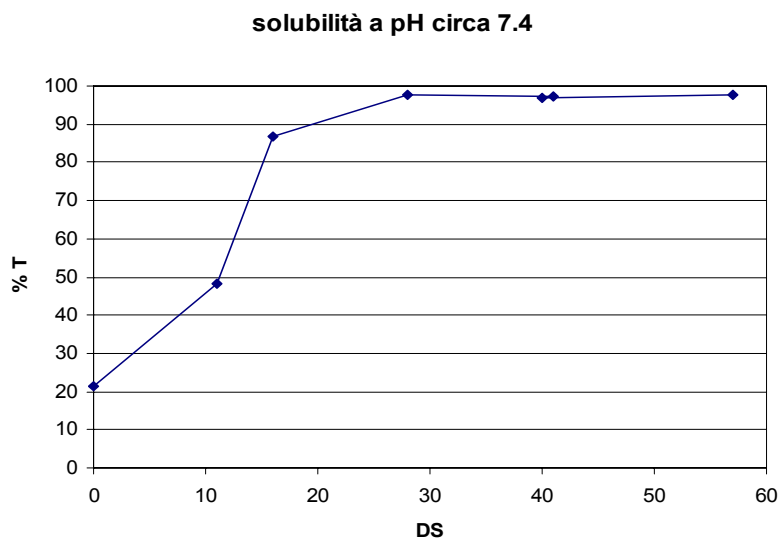


Figura 1.8. Andamento della solubilità al variare del grado di sostituzione. All'aumentare del grado di sostituzione si osserva un aumento della solubilità del polimero fino a raggiungere un plateau per i gradi di sostituzione superiori a 30.

La stessa reazione è stata condotta su chitosano a basso peso molecolare, precedentemente caratterizzato mediante viscosimetria capillare.

Dexlac

La strategia per la funzionalizzazione del destrano con residui di β -galattosio è stata necessariamente diversa da quella utilizzata per chitosano e PAMAM, essendo il destrano privo di gruppi amminici. Numerose strategie sono a disposizione per introdurre gruppi reattivi sul destrano: tutte comportano la formazione di un legame etero o estereo con gli ossidrili del polisaccaride. La strategia da noi scelta ha previsto un primo passaggio di carbossimetilazione del destrano, seguito dalla successiva reazione di coniugazione dei gruppi carbossilici così introdotti con lattosilammina, reazione mediata dalle carbodiimmidi.

La reazione di carbossimetilazione, riportata schematicamente in figura 1.9, è stata studiata in funzione del tempo di incubazione e del numero di equivalenti di acido cloroacetico aggiunti e valutata mediante titolazione potenziometrica del polimero.

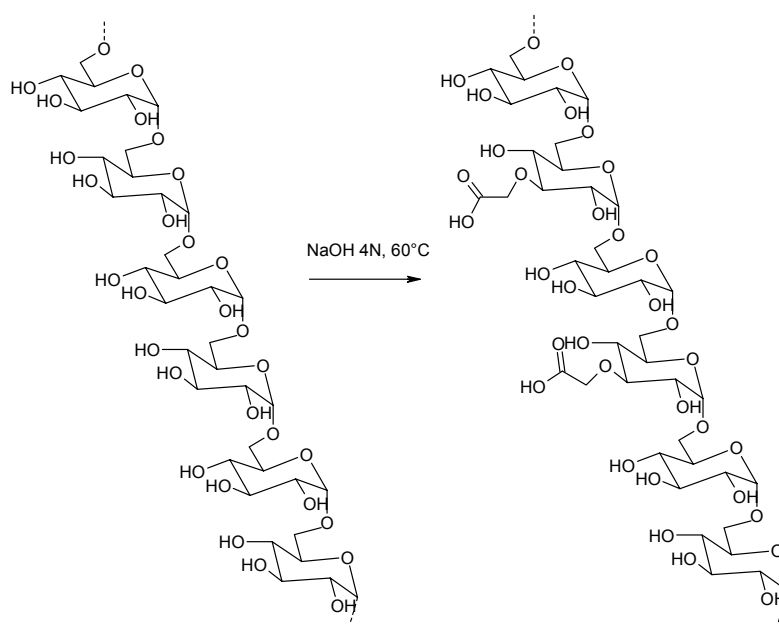


Figura 1.9. Rappresentazione schematica della reazione di carbossimetilazione del destrano.

Dalla figura 1.10 risulta evidente la linearità della relazione tra equivalenti di acido cloroacetico e grado di carbossimetilazione, mentre non è stata rilevata alcuna variazione nella resa per tempi di incubazione superiori ai 90 minuti.

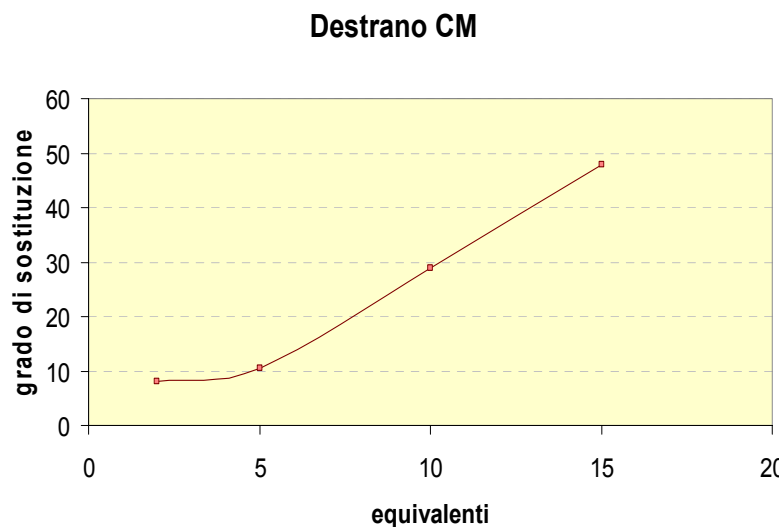


Figura 1.10. Relazione tra equivalenti di acido cloro acetico e grado di carbossimetilazione. Al di sopra di 5 equivalenti si osserva un andamento lineare.

La seconda parte della reazione è consistita nella coniugazione, mediante formazione di legame ammidico, di lattosilammina. La reazione è stata condotta a pH 4.5 e non a pH 6.5, giudicato il pH ottimale nel caso si usino EDC e NHS come attivatori, a causa della labilità della lattosilammina a pH neutri. Il composto ottenuto è stato analizzato all' $^1\text{H-NMR}$ da cui è risultata una completa funzionalizzazione dei gruppi carbossilici (figura 1.11).

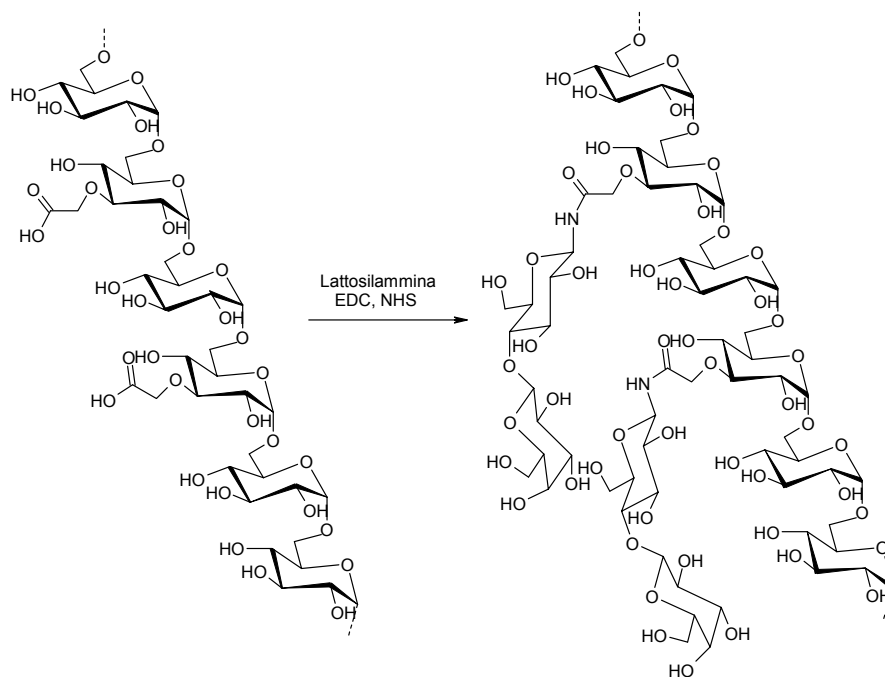


Figura 1.11. Dexlac

E' da notare che questo polimero, a differenza del chitlac e del destrano mantiene entrambi gli anelli del lattosio in forma piranosidica, e di ciò bisogna tener conto per la valutazione della sua interazione con le galectine, che dimostrano un'elevata affinità in particolare per i disaccaridi lattosio e N-acetilattosammina.

PAMAM

La lattosilazione del PAMAM è stata ottenuta mediante amminazione riduttiva delle ammine primarie presenti su ciascun braccio, con una strategia analoga a quella utilizzata per il chitosano. In questo caso gli spettri NMR dimostrano che è stata ottenuta la completa sostituzione delle 256 ammine presenti su ciascuna molecola di dendrimero, come si può dedurre dalla completa scomparsa dei segnali 1 (2.75 ppm) e 2 (3.25 ppm) attribuiti ai protoni metilenici delle posizioni terminali e dalla comparsa del doppietto a 4.5 ppm corrispondente al protone anomero del galattosio in forma piranosidica.

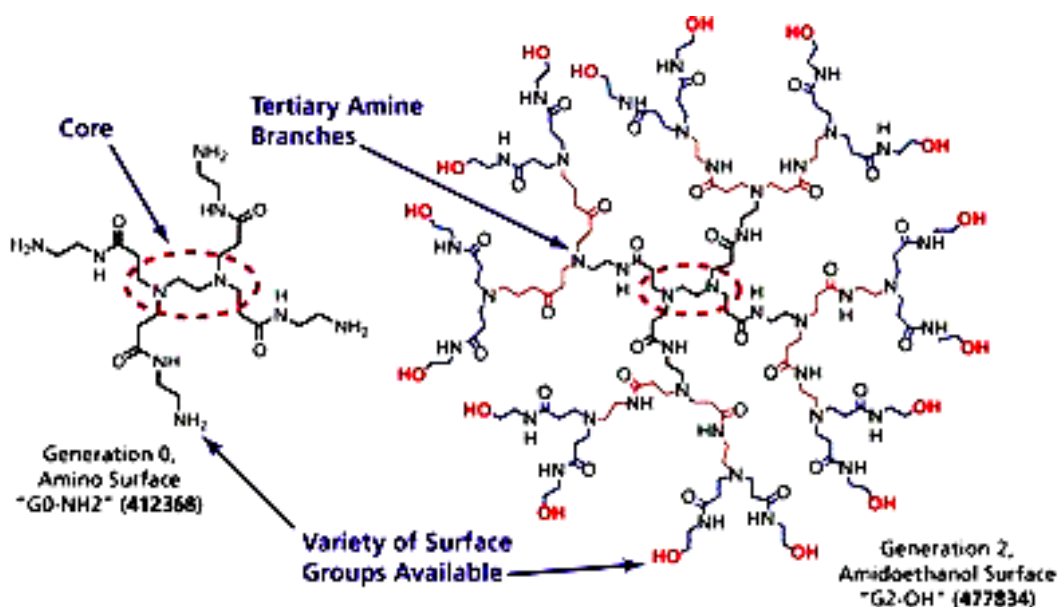


Figura 1.12 Struttura del core e dei bracci di un dendrimero PAMAM di generazione 2

La figura 1.13 riporta in dettaglio i segnali considerati per la quantificazione all'NMR del grado di lattosilazione del PAMAM.

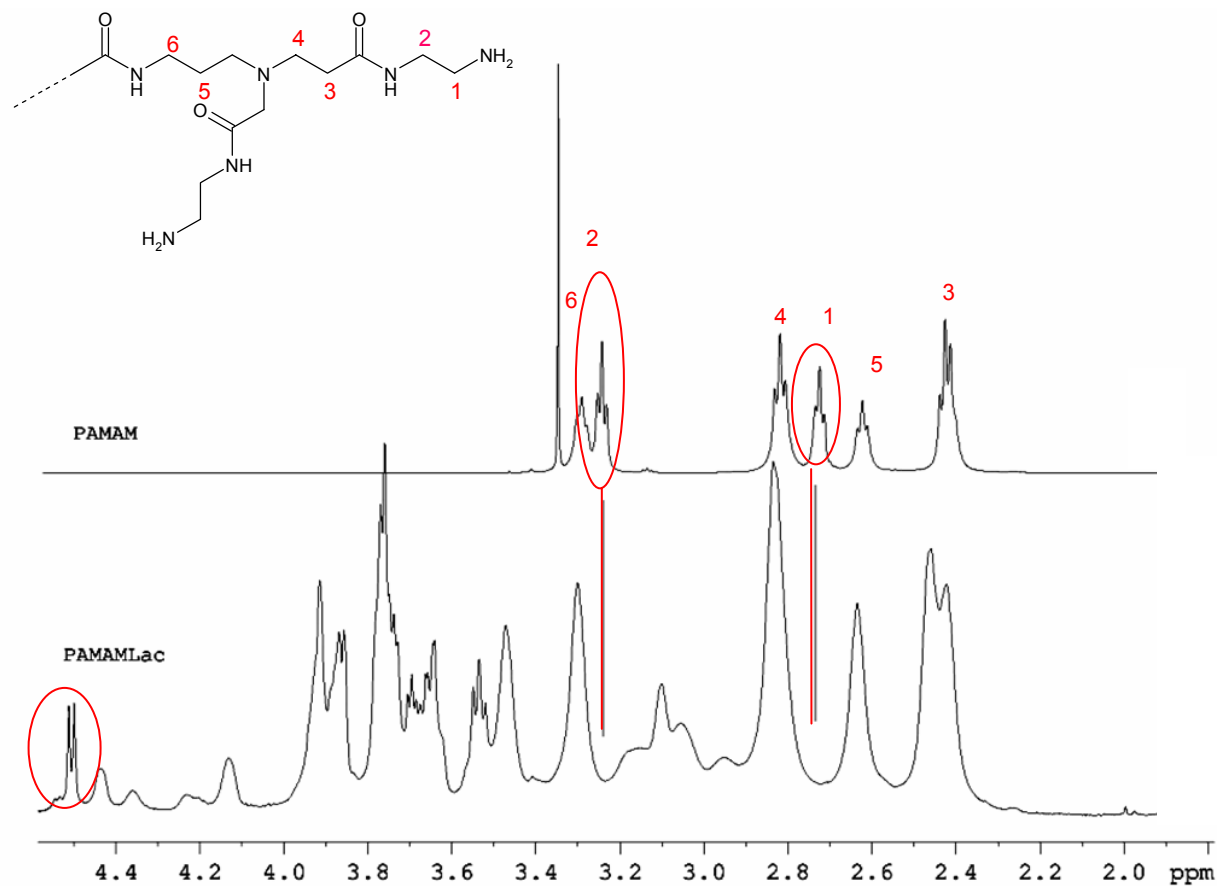


Figura 1.13 Analisi 1H-NMR. Sopra, lo spettro del PAMAM; sotto, lo spettro del PAMAMLac. Nei cerchi sono evidenziati i protoni 1 e 2 shiftati dal legame con il lattosio.

1.4 CONCLUSIONI

Nel corso di questa parte del lavoro sono state messe a punto le procedure per la sintesi e caratterizzazione di una serie di strutture macromolecolari funzionalizzate con pendagli di galattosio. Le tre macromolecole (chitlac, PAMAM e destrano) presentano una diversa distribuzione spaziale del galattosio, e potrebbero prestarsi all'interazione con diverse strutture dei recettori per il galattosio.

CAPITOLO 2

STUDI DI AFFINITA' TRA CHITLAC E GALECTINE

2.1 INTRODUZIONE

2.1.1 *Interazioni Indipendenti e Cooperative*

Una macromolecola dà luogo ad interazioni (“legami”) di tipo cooperativo se la sua affinità intrinseca nei confronti di un determinato ligando varia al variare della concentrazione del ligando. Si parlerà di cooperatività positiva se tale affinità aumenta all’aumentare della concentrazione di ligando. In altre parole, dopo che è avvenuta la prima interazione tra ligando e recettore è facilitato il legame di altre molecole di ligando sulla macromolecola. Naturalmente, affinché possa verificarsi un legame di tipo cooperativo è necessario che la macromolecola posseda più siti di legame, poiché la cooperatività è il risultato proprio dell’interazione tra i diversi siti di legame.

La cooperatività è una caratteristica essenziale di molti sistemi biochimici, in particolare degli enzimi e dei recettori.

Essa può risultare dal contributo all’energia di legame da parte di interazioni secondarie con il substrato o da effetti allosterici, come nel caso del legame dell’ossigeno all’emoglobina. Questo tipo di cooperatività prevede cambiamenti, indotti dal ligando, nella conformazione della proteina (Klein, 2003).

Un caso abbastanza complesso è quello dell’interazione tra molecole di natura saccaridica con proteine in grado di riconoscerle in modo specifico.

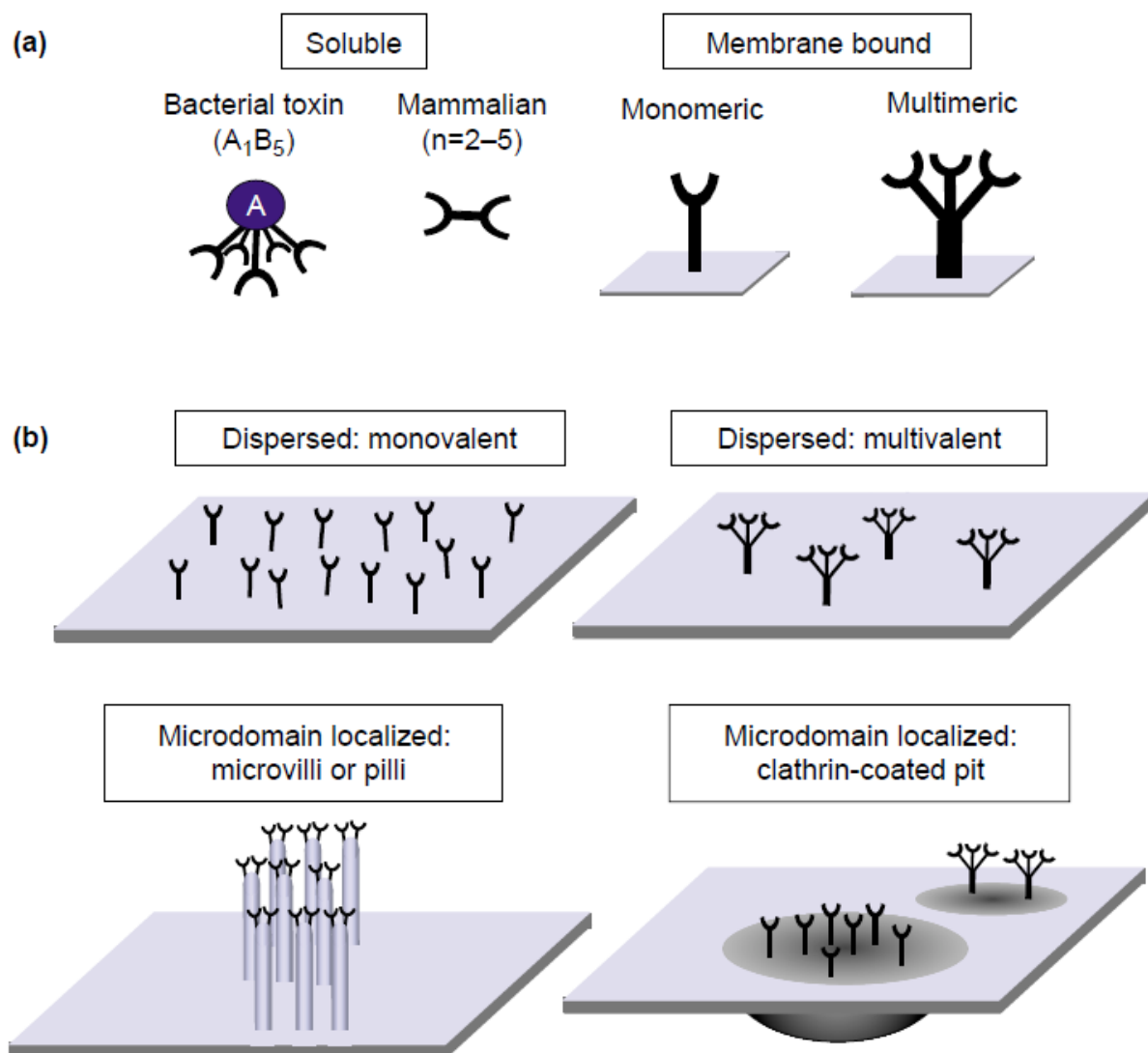
In natura è presente una grandissima varietà di sequenze di glicani, che possono essere portate da proteine (glicoproteine e proteoglicani) e lipidi (glicolipidi) a formare un “cappotto” sulla membrana cellulare. Ciascuna cellula produce una serie precisa di glicani contenenti informazioni strutturali uniche per quella particolare cellula. Proteine in grado di legare tali strutture, le GBP (*Glycan-Binding Proteins*) utilizzano i glicani per mediare meccanismi cellulari (Collins, 2004).

Alle GBP appartiene la famiglia delle galectine (per un approfondimento sulle galectine, si veda il capitolo III dell’*Introduzione Generale*).

Inoltre, anche virus e altri agenti patogeni sfruttano le GBP per aderire e colonizzare l'ospite e rilasciare le loro tossine. L'interazione tra queste proteine ed i loro ligandi avviene con un'affinità generalmente bassa, con una K_D che va dal μM al mM e quindi con una K_A dell'ordine di 10^3 - 10^6 M^{-1} . In molti casi le interazioni multivalenti, originate dalla simultanea interazione tra più GBP ed i loro ligandi, compensano la bassa affinità dando origine a forze adesive sufficientemente elevate. Come illustrato in figura 2.1, le GBP possono essere in soluzione o ancorate alla membrana, in questo caso esse possono essere disperse oppure localizzate in microdomini sulla superficie della cellula.

Grazie alle grandi dimensioni e alla presentazione di glicani distribuiti in maniera casuale, i glicoconiugati di grandi dimensioni permettono legami multivalente alle GBP presenti sulla superficie di membrane cellulari o di piastre ELISA (Collins, 2004).

Un esempio dell'utilizzo in natura dei legami multivalenti è rappresentato dal richiamo dei leucociti nel sito d'infiammazione. Tale evento prevede l'interazione tra i glicani di superficie dei leucociti e le selectine esposte sull'endotelio vasale. Perché il fenomeno del *rolling* (primo evento per l'extravasazione delle cellule dell'immunità) avvenga, le selectine necessitano di legami multivalenti con i glicani con eventi rapidi di legame e rilascio. Anche la clusterizzazione delle selectine sui microvilli risulta importante affinché il *rolling* avvenga.



Current Opinion in Chemical Biology

Figura 2.1. Espressione delle GBP. a) Le GBP possono essere presenti come proteine solubili o legate alla membrana cellulare; b) rappresentazione delle possibili distribuzioni delle GBP sulla superficie cellulare.

Per quanto riguarda le galectine, la struttura saccaridica riconosciuta è quella dei β -galattosidi, con una preferenza per le strutture disaccaridiche del lattosio e dell'*N*-acetillattosamina, che possono trovarsi sia in posizione terminale che all'interno della catena oligosaccaridica. Quando le galectine associano in modo dimerico, che è la modalità più comune, la struttura terziaria e quaternaria assunta presenta i due monomeri associati in modo non covalente in posizione opposta al sito di legame. Infatti i due siti di legame si trovano piuttosto distanti tra loro (circa 50 Å), posizionati sulle parti opposte di un dimero oblunco, e, cosa più importante,

i siti puntano in direzioni opposte (figura 2.2). Questa orientazione è completamente diversa da quella di molte proteine di membrana, come ad esempio le lectine epatiche, in cui i siti di legame puntano generalmente nella stessa direzione (Lee, 2000).

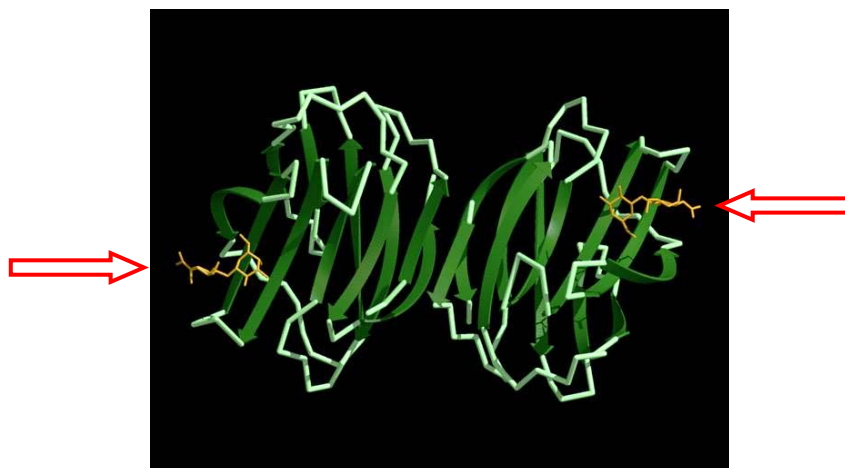


Figura 2.2. Struttura a nastro del complesso tra una Galectina dimerica e due molecole di lattosio.

L'affinità di legame delle galectine per i loro ligandi naturali è piuttosto bassa, e la K_D è dell'ordine del mM. Ci sono casi tuttavia, nei quali l'affinità di legame risulta aumentata quando la struttura saccaridica che interagisce è più estesa ed è in grado di coprire altre aree della superficie proteica, e viene anche amplificata da interazioni proteina-proteina. Sia la *clusterizzazione* dei siti di legame della lectina, così come quella delle unità saccaridiche riconosciute (Lee, 2000) portano solitamente ad un notevole aumento di diversi ordini di grandezza dell'affinità di legame.

Bisogna però tenere presente il ruolo dell'orientazione e della direzione dei siti di legame. Quando i siti di legame puntano in due direzioni opposte, come nel caso delle galectine, è improbabile che una lectina riesca a legare un legante multivalente in più siti. Da un punto di vista sterico, l'interazione più semplice è il *cross-linking* della struttura proteica (figura 2.3) ed è prevedibile che un esteso *cross-linking* produca un aumento di affinità, dovuto probabilmente ad una diminuzione della velocità di dissociazione del substrato (Lee, 2000).

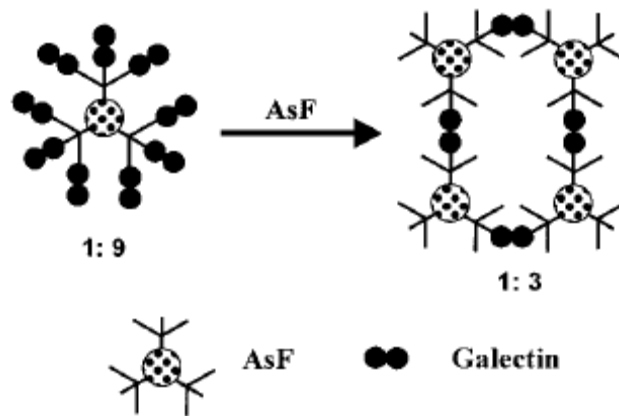
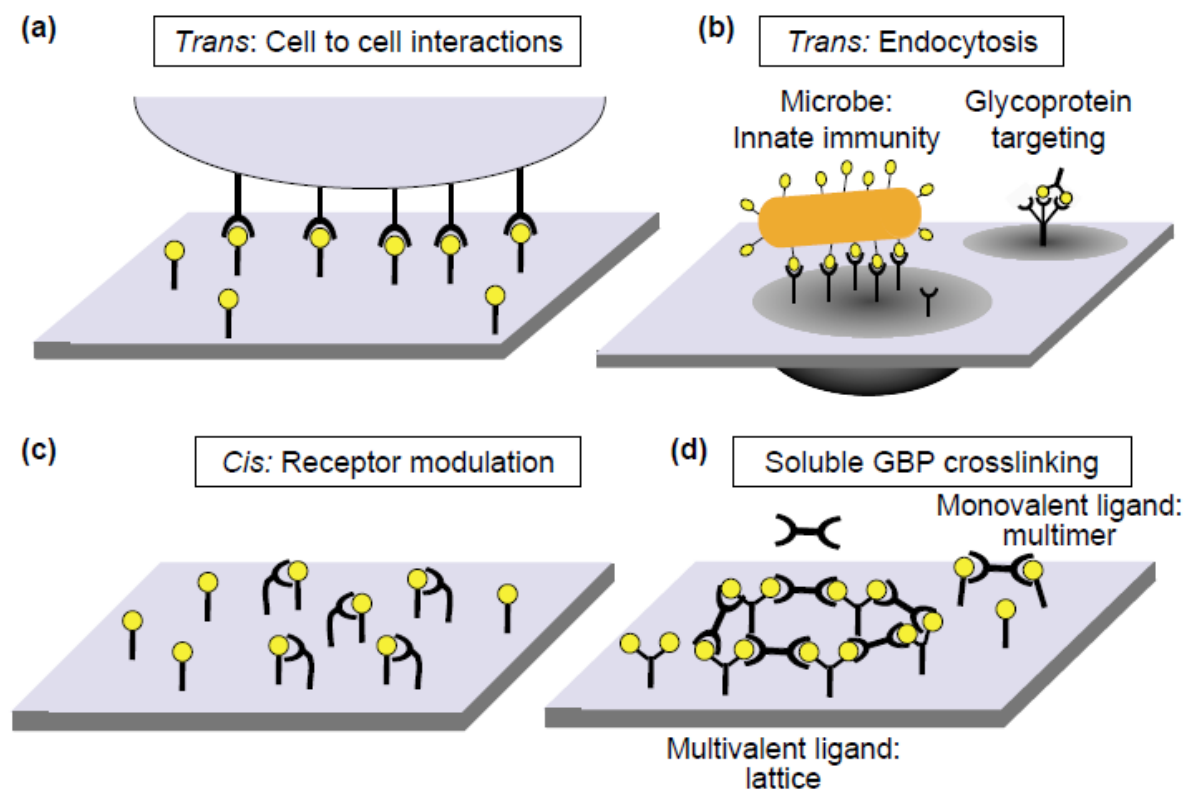


Figura 2.3. Modello di cross-linking tra galectine dimeriche in presenza di asialo fetuina (AsF). All'aumentare del numero di molecole di AsF, aumenta il rapporto AsF/Galectina.

Il legame tra glicani e GBP può essere di vario tipo (figura 2.4): l'interazione definita *trans* si esplica tra due cellule (tipica nei rapporti tra le cellule costituenti un tessuto) oppure tra una cellula e un agente patogeno, a cui può seguire l'evento di endocitosi; l'interazione di tipo *cis* è data dal legame glicano-GBP presenti sulla superficie della stessa cellula (un esempio è dato dalla lectina CD22 presente sulla superficie delle cellule B assieme al ligando glicanico da essa riconosciuto) (Collins, 2004).



Current Opinion in Chemical Biology

Figura 2.4. Legame tra le GBP e i glicani. I legami tra GBP e i glicani possono essere di diverso tipo permettendo interazioni che modulano l'attività cellulare e la sua risposta ad agenti patogeni. In (d) è rappresentata una tipica interazione che può avvenire tra la Galectina-1, dimerica, in soluzione e i glicani di superficie: il legame multivalente porta alla formazione di una struttura reticolare.

2.1.2 Surface Plasmon Resonance

La risonanza plasmonica di superficie (*Surface Plasmon Resonance* - SPR) è una tecnica di analisi capace di convertire una risposta biologica in segnale elettrico che può essere amplificato.

Tramite l'uso di biosensori è possibile individuare il riconoscimento di una molecola da parte di strutture biologiche (e.g. proteine ed enzimi), come ad esempio il riconoscimento antigene-anticorpo o substrato-recettore. Tali interazioni inducono variazioni sensibili del biosensore in termini di massa, temperatura, proprietà ottiche o parametri elettro-chimici (conduttività, potenziale, ecc.) .

L'SPR è in grado di rilevare interazioni di legame monitorando la riflessione di un fascio di luce polarizzata inviato all'interfaccia tra una soluzione acquosa di molecole potenzialmente leganti ed una superficie recante la controparte molecolare immobilizzata.

Questa tecnica viene utilizzata per la determinazione delle cinetiche di associazione e dissociazione tra due molecole.

La struttura base del biosensore è costituita da un chip ricoperto da un film d'oro. Il film d'oro viene posto in stretto contatto con un prisma attraverso cui viene fatta passare un fascio di luce polarizzata; una parte dell'energia della luce interagisce con la nube elettronica del film metallico, generando un *plasmon*, ossia un'oscillazione di elettroni ad angoli perpendicolari rispetto al piano del film, che rimbalzano tra la superficie superiore e quella inferiore. Il plasmon, per contro, genera un campo elettrico che si estende lungo una distanza breve, circa pari alla lunghezza d'onda della luce, sopra e sotto la superficie metallica. Qualunque variazione nella composizione dell'ambiente all'interno del raggio del campo elettrico causa una variazione misurabile dell'angolo di risonanza (Alberts, 2002).

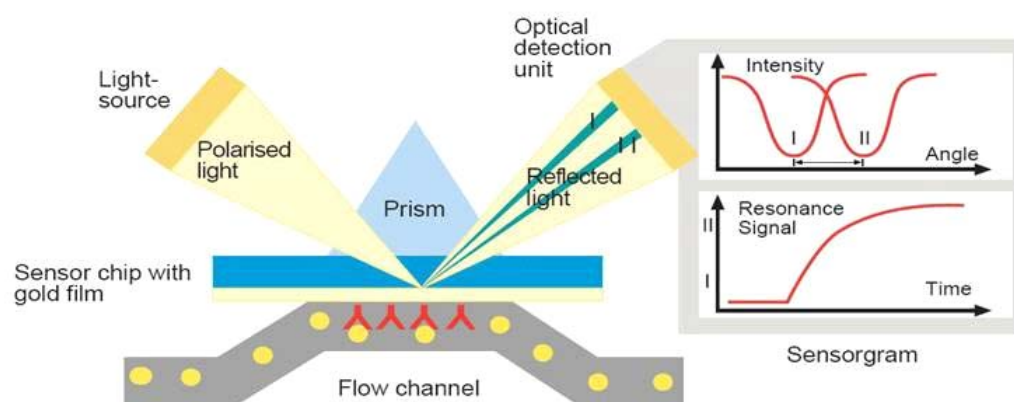


Figura 2.5. Rappresentazione schematica della risonanza plasmonica di superficie.

Per misurare l'affinità di un legame, si inietta una soluzione contenente l'analita lungo la superficie del chip sul quale è stata preventivamente immobilizzata una molecola di interesse. Quando l'analita lega la molecola presente sul chip, la composizione molecolare dei complessi presenti sulla superficie metallica varia causando un cambiamento dell'angolo di rifrazione. Tale cambiamento viene registrato come segnale SPR, o unità di risonanza (RU) (Varki, 2008).

La misurazione del legame molecolare avviene in tempo reale fornendo informazioni riguardanti le cinetiche di associazione (k_a) e dissociazione (k_d) adottando un modello unimolecolare (1:1) da cui è possibile calcolare la costante di affinità (K_A).

$$K_A = k_a/k_d = [LA]/[L][A]$$

dove L rappresenta il ligando (molecola legata al chip), A rappresenta l'analita (molecola nella fase mobile) e LA il loro complesso.

La costante di affinità può essere anche determinata indipendentemente dalle due costanti cinetiche, in base al valore di risonanza raggiunto quando il sistema raggiunge l'equilibrio (*plateau*).

Sono disponibili diverse strategie di legame chimico tra il ligando e la superficie del chip, come reazioni con ammine, tioli, aldeidi. Normalmente il legame che si viene a formare è stabile ed il chip così derivatizzato può essere riutilizzato più volte.

Il vantaggio di questa tecnica risiede nel fatto che si possono misurare affinità che vanno dal milli- al picomolare. Inoltre, l'intervallo di concentrazioni di analita utilizzate è pari a 0.1-100 x K_D ed i volumi utilizzati sono dell'ordine di 0.1 mL.

Un limite della tecnica è che gli analiti devono avere una massa sufficientemente grande da apportare una significativa variazione in RU qualora avvenga il legame (Varki, 2008).

Leader nella strumentazione SPR è la Biacore Life Sciences che produce un sistema chiamato BIAcore; spesso il termine SPR viene sostituito dal nome commerciale BIAcore.

2.2 MATERIALI E METODI:

L'intensità dell'interazione tra Chitlac e galectine è stata misurata utilizzando il Biacore TM 2000 Instrument (BIAcore, Uppsala, Sweden). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando un Sensor Chip CM5 (research grade - chimica di tipo amminico per il legame) (GE Healthcare) derivatizzato secondo le istruzioni del produttore. Gli analiti utilizzati negli esperimenti sono stati iniettati disciolti in tampone PBS (Phosphate Buffer Saline) addizionato del detergente P20 (Biacore) allo 0.005% e alla velocità di 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Il chip è stato rigenerato tramite iniezione pulsata (10 μL) di lattosio 10 mM. L'analisi dei dati è stata effettuata per mezzo del BIAevaluation 3.2 Software (Biacore). Per ottenere le costanti cinetiche e di equilibrio tramite il software BIAevaluation, conservativamente è stato utilizzato il semplice modello Langmuir 1:1 (Nix, 2003).

Immobilizzazione del Chitlac sul Chip

Il Chitlac, disciolto in tampone acetato pH 4.5 alla concentrazione di 0.05 g/L, è stato fatto fluire ad una velocità di 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ sulla superficie opportunamente attivata, fino ad ottenere una risposta finale di segnale SPR di circa 800 RU. Tutte le misurazioni sono state effettuate in una soluzione di PBS (pH 7) contenente DTT (2 mM) e il detergente P20 (0.005%). La soluzione di galectina, alla concentrazione di 0.12-10 μM , è stata iniettata nello strumento e fatta fluire sulla superficie del chip ad una velocità di 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Sono state utilizzate tutte le quattro celle di flusso (Fc) in sequenza. La cella Fc1 è stata attivata e deactivated senza ligando e utilizzata come controllo negativo.

Immobilizzazione della Galectina-3 al Chip

La galectina 3, alla concentrazione di 20 mg/L e di 200 mg/L, è stata fatta fluire ad una velocità di 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ sulla superficie opportunamente attivata, fino ad ottenere una risposta finale di segnale SPR rispettivamente pari a 1251.9 RU e 2273.5 RU.

Tutte le misurazioni sono state effettuate in una soluzione di PBS (pH 7) contenente il detergente P20 (0.005%). Come controllo è stato immobilizzato su un altro canale dello stesso chip (Fc1) la BSA iniettata alla concentrazione di 20 mg/L. La soluzione di Chitlac, alla concentrazione di 50-500 μM , è stata iniettata nello strumento e fatta fluire sulla superficie del chip ad una velocità di 30 $\mu\text{L}/\text{min}$.

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi SPR

Per determinare la costante di affinità tra Galectina e derivati galattosilati è stata presa in considerazione la tecnica di *Surface Plasmon Resonance (SPR)*.

Si è voluto verificare il potenziale aumento dell'affinità, partendo dal principio della clusterizzazione di strutture galattosilate per le galectine.

Da quanto detto nei paragrafi precedenti, è evidente che è importante, quando si desidera ricercare il grado di affinità tra strutture glicaniche e lectine, considerare le possibili interazioni cooperative. Utilizzando il sistema SPR, che permette di individuare la costante di affinità tra due molecole tramite l'ancoraggio di una delle due parti, è buona norma programmare una serie di analisi in cui ciascuna molecola venga analizzata sia come ligando che come analita. In tal modo si possono verificare le diverse condizioni di interazione, poli- e monovalenti.

Inizialmente è stata valutata l'affinità verso le galectine, del derivato polimerico galattosilato, Chitlac, ancorato al chip.

Alcuni studi preliminari, utilizzati per la verifica dell'applicabilità della SPR alle sonde diagnostiche d'interesse, sono stati svolti in passato immobilizzando sulla superficie del chip due polisaccaridi (biotinilati all'estremità riducente), il chitosano ed il suo derivato Chitlac, e studiando la loro interazione con la Galectina-1. La costante di affinità ottenuta in questa prima serie di esperimenti era stata di $8.2 \pm 0.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Mozetic, 2007).

L'esperimento è stato ripetuto sfruttando le ammine libere del Chitlac che sono state coniugate per ammidazione al chip. Oltre alla Galectina-1, è stata determinata la costante di affinità anche per la Galectina-3.

La risposta, registrata in un ampio intervallo temporale per concentrazioni di Galectina-1 da 0.12 a 8 μM , viene riportata in figura 2.6.

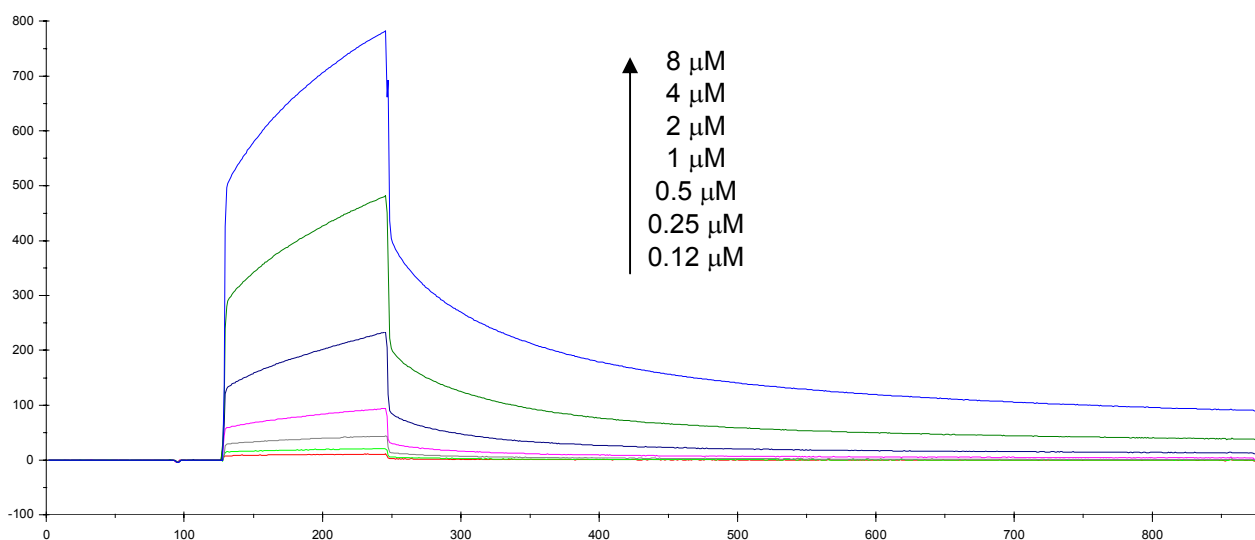


Figura 2.6. Analisi SPR mediante Biacore del legame della galectina-1 al Chitlac. Sono state utilizzate concentrazioni crescenti di galectina-1, come indicato nel grafico. Tutte le curve sono state sottratte del bianco.

I risultati dell'elaborazione sperimentale sono rappresentati in tabella 2.1.

Tabella 2.1.

Costanti cinetiche di associazione/dissociazione e costanti di affinità al variare dell'analita e del ligando.

Ligando immobilizzato	Analita	k_a	k_d	$K_A (M^{-1})^*$ (k_a/k_d)	$K_A (M^{-1})^{**}$ (dal plateau)
Chitlac	Galectina-1 (<i>ancoraggio multiplo</i>)	6×10^3	6×10^{-2}	1×10^5	4×10^5
	Galectina-1 (<i>ancoraggio singolo</i>) (Mozetic, 2007)	7×10^4	9×10^{-2}	8×10^5	8×10^5
Chitlac	Galectina-3	3×10^1	1×10^{-5}	3×10^6	3×10^6
Galectina-3	Chitlac	4×10^3	1×10^{-4}	4×10^7	---

*Costante di affinità calcolata dal rapporto delle costanti cinetiche

**Costante di affinità calcolata in base alla risposta all'equilibrio (plateau)

Per la Galectina-1, i valori di K_A (costante di affinità) ottenuti dai dati cinetici risultano del tutto confrontabili con quelli ottenuti dalle risposte all'equilibrio quando esso viene raggiunto: $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ nel primo caso e $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ nel secondo. Il valore ottenuto per la Galectina-1, ancorando il polisaccaride al chip attraverso la reazione di ammine disposte in modo casuale lungo la catena ($1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), risulta leggermente inferiore rispetto a quanto ottenuto ancorando il polisaccaride al terminale di catena ($8.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, Mozetic, 2007), rimanendo tuttavia confrontabile.

Per la Galectina-3 i corrispondenti valori di K_A sono sovrapponibili. Inoltre, l'affinità del Chitlac per la Galectina-3 ($K_A \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) risulta essere di un ordine di grandezza superiore all'affinità dello stesso polimero verso la Galectina-1 ($K_A \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$).

Per stabilire se e come l'inversione dei ruoli analita/ligando possa comportare una variazione dell'affinità, la proteina (Galectina-3) è stata ancorata alla superficie del *chip* tramite reazione di amidazione dopo attivazione dei carbossili del *chip* con NHS/EDC. Il Chitlac è stato dunque iniettato a concentrazioni variabili ed il valore di K_A registrato è risultato incrementato di un ordine di grandezza ($K_A = 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) (Tabella 2.1).

Considerando la maggiore libertà di un polisaccaride in soluzione, è ipotizzabile che esso abbia potuto esporre un maggior numero di unità galattosidiche verso le galectine ancorate e che il legame di una prima unità abbia favorito il legame delle successive, mostrando quindi una cooperatività positiva che non si verifica qualora sia il polisaccaride ad essere ancorato.

2.4 CONCLUSIONI

I dati di affinità termodinamica del sistema Chitlac/galectine ottenuti con il sistema Biacore sono stati purtroppo condizionati dalla limitata disponibilità di accesso allo strumento e quindi sono da considerarsi come preliminari. Tuttavia, si ritiene di poter formulare in modo ragionevolmente sicuro le seguenti conclusioni preliminari:

1. A parità di altre condizioni, l'affinità Chitlac/Galectina dipende dal tipo di Galectina stessa (Galectina-1 e Galectina-3) pur mantenendosi del tutto comparabile;
2. L'interazione Chitlac/Galectina non è "simmetrica": i valori di K_A sono diversi al di là del possibile errore sperimentale a seconda dell'immobilizzazione dell'uno e dell'altro degli interattori. Ciò non stupisce in considerazione della diversa dimensione molecolare e, soprattutto, della diversa quantità di siti di legame per ciascun sistema

macromolecolare (circa 2'000 per catena nel chitlac, e due per dimero nelle galectine - 1 e -3);

3. Nel caso delle diverse modalità di ancoraggio del Chitlac, i valori di K_A con Galectina-1 sono molto simili (indicando una buona riproducibilità del risultato), ma rivelano anche un valore lievemente maggiore per il caso dell'ancoraggio singolo (al terminale di catena saccaridica) rispetto a quello multiplo (e casuale). La spiegazione più semplice e razionale riconduce alla libertà conformazionale del polimero nei due casi, chiaramente maggiore nel primo rispetto al secondo;
4. Tale libertà conformazionale sembra chiaramente essere anche alla base della riscontrata "asimmetria" di valori di K_A a seconda della immobilizzazione. Nel caso in cui sia il Chitlac ad essere ancorato (pur con una modesta differenza a seconda del modo: vedi punto 3), possibili effetti cooperativi (che le poche misure attuali non permettono di rilevare neppure qualitativamente) si fermano alla di-valenza della Galectina. Viceversa, il caso dell'immobilizzazione di Galectina (peraltro molto più vicino alla verosimile situazione biologica di membrana) esalta l'enorme polivalenza del Chitlac (circa tre ordini di grandezza rispetto al dimero galectinico) e l'effetto della *clusterizzazione* dovuto alla sua grande libertà conformazionale di catena (semi)flessibile (Yalpani, 1984).

I risultati sopra esposti certamente necessitano di conferme e studi di approfondimento. Tuttavia, le conclusioni parziali raggiunte dipingono un primo quadro consistente e ragionevole delle interazioni tra lectine saccaridiche ed un glicopolimero di notevole potenziale interesse applicativo biomedico.

CAPITOLO 3

EFFETTI DEL CHITLAC SU COLTURE CELLULARI

3.1. INTRODUZIONE

3.1.1 Scelta delle Linee Cellulari

Si è scelto di determinare le interazioni tra biopolimeri e strutture cartilaginee *in vitro* utilizzando una linea primaria di condrociti in quanto cellule costituenti la cartilagine e che subiscono variazioni metaboliche durante la presenza di una patologia artritica (come già discusso nell'*Introduzione Generale*). Inoltre, si è deciso di utilizzare una linea di epatociti (HepG2) poiché è nota l'esistenza di un riconoscimento specifico tra il recettore per le asialoglicoproteine e ligandi galattosidici che è stato dimostrato essere un fattore decisivo nel mediare l'adesione degli epatociti e nel mantenere alcune loro specifiche funzioni (Yin, 2002).

Le HepG2 verranno quindi qui considerate come controllo positivo di interazione polimero galattosilato/cellula.

3.1.2 Citofluorimetria a Flusso

La citofluorimetria a flusso è una tecnica di misurazione multiparametrica di caratteristiche fisiche e/o chimiche condotta su cellule in sospensione all'interno di un fluido di trasporto. Le cellule/particelle passano allineate attraverso un sistema di rilevazione ottico/elettronico.

Il tipo di parametri attualmente rilevabili in citofluorimetria a flusso è molto ampio: volume e complessità morfologica delle cellule, contenuto di pigmenti, DNA, RNA, proteine, antigeni di superficie ed intracellulari, pH, flussi di Ca^{2+} , etc.

Aspetto peculiare della citofluorimetria a flusso – strettamente connesso alla possibilità di analizzare contemporaneamente più fluorescenze – è quello di raccogliere e memorizzare molti parametri per ogni singola cellula analizzata, parametri che correlati tra loro permettono di individuare e studiare sottopopolazioni (anche rare) di cellule.

Dal punto di vista della strumentazione il campione viene iniettato attraverso un canale posto centralmente rispetto ad un serbatoio esterno. Lungo il serbatoio esterno scorre un fluido a

velocità maggiore. Il movimento del fluido lungo il serbatoio esterno causa un imponente effetto trainante sul serbatoio centrale. Ciò causa un incremento della velocità al centro del canale e annulla la velocità lungo le pareti del canale stesso. In tal modo si crea una singola fila di particelle, evento che prende il nome di *focusing* idrodinamico. A questo punto ciascuna particella passa attraverso uno o più laser i quali subiranno *scattering* o emissione di fluorescenza se la particella è legata ad un fluorocromo. Tali eventi, caratteristici, forniscono informazioni riguardo le proprietà della particella colpita.

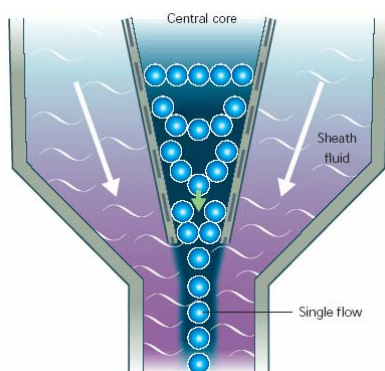


Figura 3.1. Formazione del flusso a singola particella

La luce che subisce scattering nella direzione frontale viene raccolta da una lente chiamata canale di *forward scatter* (FSC). L'intensità di FSC correla con le dimensioni della particella e può essere utilizzata per impostare un valore "soglia" di dimensioni al fine di individuare detriti cellulari discriminandoli dalle cellule integre.

La luce raccolta a 90° rispetto alla linea di eccitazione viene chiamata *side scatter*; il canale di *side scatter* (SSC) fornisce informazioni sul contenuto granulare della particella. FSC e SSC sono unici per ciascuna particella e la combinazione dei due dati può essere utilizzata per differenziare cellule presenti in un campione eterogeneo.

L'uso di filtri ottici e fotomoltiplicatori, permette di raccogliere in diversi canali di fluorescenza la luce emessa a determinate lunghezze d'onda, potendo quindi "vedere" e discriminare oggetti a cui vengono legate diverse sonde fluorescenti (Rahman, 2006); il valore viene restituito come MFI (*Mean Fluorescent Intensity*), canale medio di fluorescenza.

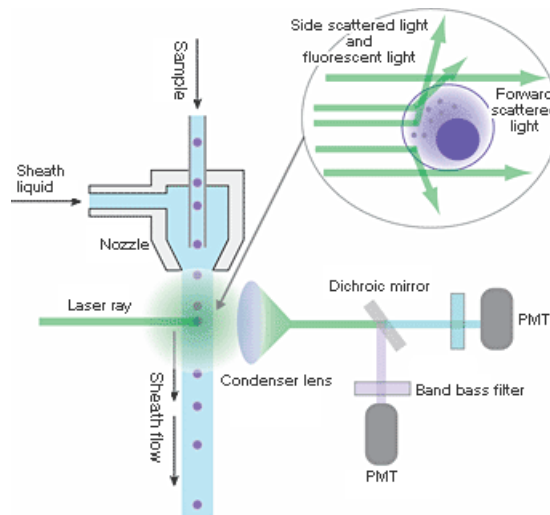


Figura 3.2. Rappresentazione schematica del citofluorimetro a flusso

3.1.3 Microscopia Confocale

La microscopia confocale è una tecnica di imaging ottico usata per ricostruire immagini tridimensionali, sfruttando un foro stenopeico (*pinhole*) per eliminare la luce fuori dal fuoco in campioni che hanno spessore maggiore del piano focale. Il principio del microscopio confocale fu brevettato nel 1957 da Marvin Minsky. In un microscopio a fluorescenza convenzionale, l'intero campione si trova colpito dalla luce emessa dalla sorgente. A causa della conservazione dell'intensità della luce trasportata, tutte le parti del campione si troveranno eccitate dalla radiazione ed emetteranno una fluorescenza che viene raccolta da un *fotodetector*. Al contrario, un microscopio confocale utilizza l'illuminazione puntuale e una fessura in un piano otticamente coniugato posto davanti al *detector*, in modo tale da eliminare le informazioni fuori fuoco. Solo la luce all'interno del piano focale raggiunge il *detector*: si ottiene in tal modo un'immagine di qualità molto più elevata rispetto alla microscopia tradizionale. Poiché solo un punto alla volta del campione viene illuminato, per ottenere immagini 2D o 3D è necessario compiere una serie di scansioni con fuoco diverso.

Uno svantaggio della raccolta dell'immagine in un solo punto del campione è il basso numero di fotoni che viene emesso e che viene raccolto istante per istante. Per evitare dunque la formazione di un forte rumore di fondo è necessario illuminare ciascun punto per un tempo sufficientemente lungo per poter acquisire un quantità di luce sufficiente per poter effettuare una misurazione accurata. In tal modo l'immagine viene ottenuta in tempi non brevi. L'utilizzo di una sorgente di luce ad altissima intensità, come la luce laser che oltretutto presenta il vantaggio di essere disponibile in un ampio spettro di lunghezze d'onda, permette di ottenere immagini ad alta risoluzione in tempi brevi.

La luce laser colpisce uno specchio dicroico che la riflette direzionandola verso specchi assemblati orizzontalmente e verticalmente. Questi specchi permettono al laser di analizzare il campione. La luce fluorescente riflessa dal campione viene dunque rilevata e a sua volta scandita attraverso gli stessi specchi dicroici che la convogliano in un foro. La luce che passa attraverso il foro giunge ad un *detector* costituito da un tubo fotomoltiplicatore. Nella microscopia confocale il campione non viene mai rilevato in un'immagine intera poiché in ogni istante esso viene analizzato in un singolo punto. Dunque, per la visualizzazione è necessario collegare al *detector* un computer in grado di elaborare l'immagine analizzando un pixel alla volta. La luce che si trova fuori dal fuoco viene esclusa dal foro permettendo dunque di ottenere un'immagine nitida. In tal modo il campione viene "sezionato" permettendo di ottenere immagini bidimensionali su diversi piani. È possibile quindi sovrapporre i piani per formare un'immagine tridimensionale, oppure visualizzare singoli piani per poter per esempio discriminare se una determinata sostanza fluorescente sia presente sulla sola superficie cellulare o anche al suo interno (Semwogerere, 2006).

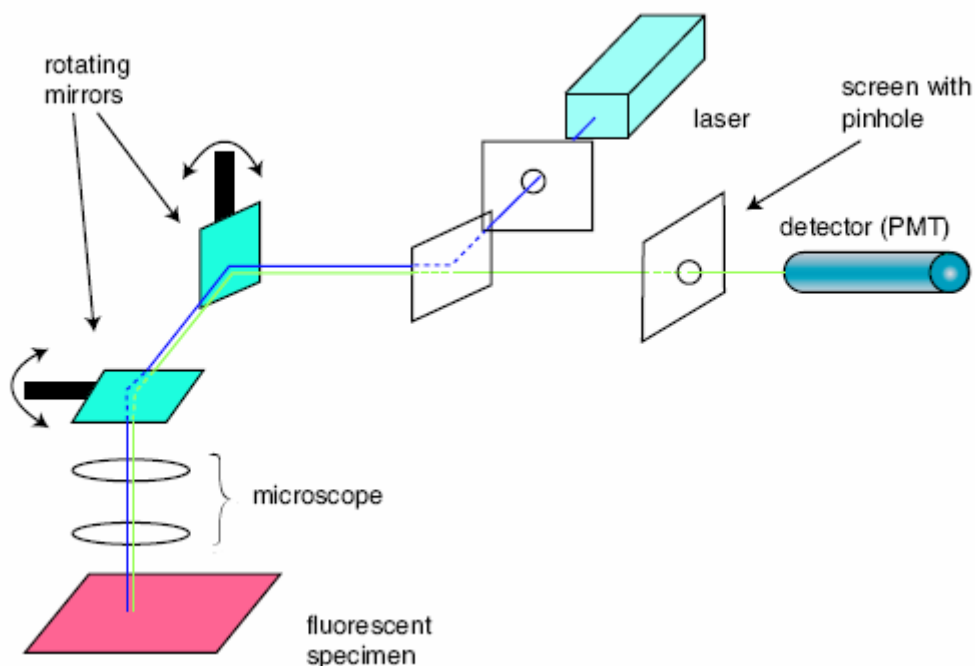


Figura 3.3. Rappresentazione schematica del microscopio a confocale

3.2 MATERIALI E METODI

Isolamento dei Condrociti

Campioni di cartilagine articolare sono stati prelevati dall'estremità prossimale dell'omero di maiali di 7 mesi di età circa e di circa 150 kg di peso. Subito dopo la macellazione, l'intera struttura articolare è stata prelevata e privata del grasso e del tessuto muscolare, mantenendo la capsula articolare intatta. In condizioni di sterilità, all'apertura della capsula articolare, sono state prelevate fettine sottili di cartilagine che sono quindi state poste in soluzione di PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 8.1 mM; CaCl₂ 0.9 mM; MgCl₂ 0.49 mM; pH 7.74) contenente ialuronidasi (270 U/mL; Sigma, tipo I-S). La cartilagine è stata quindi finemente sminuzzata e trasferita in una soluzione di collagenasi 250 U/mL (Worthington, tipo II; 1 g di tessuto/10 mL soluzione) in PBS in presenza di penicillina (500 U/mL; Sigma) e streptomina (500 U/mL; Sigma).

Dopo 15 ore di digestione enzimatica a 37°C in bagno Dubnoff sotto agitazione (80 oscillazioni al minuto), la soluzione è stata filtrata mediante retino plancton, con pori di 20 µm. Il filtrato è stato quindi centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti e le cellule sono state lavate con PBS e risospese in 1-2 mL di terreno completo. Dopo conta per mezzo di una camera di Burcker, le cellule sono state seminate in fiasche alla concentrazione di 5 x 10⁵ cellule/mL, in *Dulbecco's Minimal Essential Medium* (DMEM; Sigma) addizionato di 10% di Siero Fetale Bovino (FBS; Sigma), L-glutamina 2 mM (Sigma), penicillina 500 U/mL e streptomina 500 U/mL. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C al 5% di CO₂ per 24 ore prima del loro utilizzo.

HepG2

La linea cellulare HepG2 da epatocarcinoma umano (ATCC HB 8065) è stata coltivata in terreno DMEM (Sigma) addizionato di 10% siero fetale bovino, 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina, a 37°C in un'atmosfera al 5% CO₂.

Analisi Citofluorimetriche

Tutte le analisi citofluorimetriche sono state effettuate utilizzando lo strumento Cytomics FC500 (Beckman-Coulter Inc, Fullerton, CA, USA) equipaggiato con un laser ad Argon (488 nm, 5 mV) e un sistema standard di configurazione per la rilevazione con filtri nel canale del rosso (575 nm, FL2; 610 nm, FL3) e del verde (525 nm, FL1). Sono stati acquisiti almeno 10'000 eventi per ciascun campione. Le acquisizioni sono state salvate come *file listmode* per

essere successivamente elaborate. Gli istogrammi FL1 sono stati analizzati con il software WinMDI (Dr. J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) al fine di rilevare i valori di intensità di fluorescenza per ciascun campione, espressi come MFI (*Mean Fluorescence Intensity*).

3.2.1 Determinazione dell'Internalizzazione dei Polimeri

Per determinare l'internalizzazione dei polimeri, in particolare del Chitlac, si è voluto sfruttare il *quenching* della fluoresceina legata ai polimeri analizzati, da parte del Trypan Blue, una molecola non in grado di oltrepassare la membrana di cellule sane (Rejman, 2005; Vasselon, 1999; Ma, 2003). Tutte le analisi sono state condotte in triplicato.

Coniugazione dei Polimeri con Fluoresceina

200 mg di ciascun polimero liofilizzato vengono sciolti in 70 mL di tampone bicarbonato 0.5M. Contemporaneamente 5 mg di fluoresceina isotiocianato (FITC) sono stati sciolti in 1 mL dello stesso tampone. 20 μ L della soluzione di fluoresceina sono stati aggiunti a ciascuna delle soluzioni contenente il polimero. Le soluzioni sono state mantenute sotto agitazione per 24h, quindi dializzate dapprima contro bicarbonato di sodio 0.1M e quindi contro acqua bi-distillata, infine liofilizzate. L'assenza di fluoresceina libera nel liofilo è stata verificata all'NMR.

Coniugazione dei Polimeri con Rodamina B

74 mg di Chitlac sono stati sciolti in 26.6 mL di tampone bicarbonato 0.5M. Contemporaneamente 6.8 mg di Rodamina B sono stati sciolti in 1 mL dello stesso tampone. 8.86 μ L della soluzione di Rodamina B sono stati aggiunti alla soluzione contenente il polimero e mantenuti sotto agitazione per 24h. Successivamente si è provveduto a dializzare la soluzione dapprima contro bicarbonato di sodio 0.1M e quindi contro acqua bi-distillata, infine il campione è stato liofilizzato.

Studi Preliminari di Quenching

Studi preliminari per verificare il *quenching* della fluorescenza della fluoresceina legata al Chitlac da parte del Trypan Blue sono stati condotti al fluorimetro (modello Perkin-Elmer LS 50B) impostando λ di eccitazione pari a 494 nm e λ di emissione pari a 518 nm.

Come bianco si è scelto di utilizzare il medium completo in cui crescono le cellule (DMEM). Sono state poi analizzate soluzioni di Chitlac fluoresceinato a diverse concentrazioni (1%, 0.5%, 0.1%; p/v) in DMEM completo.

I campioni sono stati analizzati tal quali (volume finale 1.5 mL) e con aggiunte di Trypan Blue (TB, Sigma, concentrazione stock: 1%).

3.2.1.1 Citofluorimetria a Flusso

I condrociti primari, lasciati crescere in fiasche, sono stati staccati tramite l'uso di tripsina (Sigma) e contati. Le cellule sono state seminate in piastre da sei pozzetti alla densità di 1×10^6 cellule per pozzetto e lasciate aderire per 24 ore in terreno DMEM completo. Due pozzetti sono stati trattati con ChitlacFITC o ChitlacRhod all' 1% (p/v) in terreno completo. I due pozzetti di controllo sono invece stati addizionati di solo medium fresco. Dopo 24 ore dal trattamento, le cellule sono state lavate due volte con PBS, staccate con uno *scraper*, centrifugate e quindi risospese in 500 μ L di PBS. La stessa procedura è stata seguita per i pozzetti contenenti le cellule non trattate (controlli).

Una prima analisi al citofluorimetro è stata effettuata sulla sospensione cellulare tal quale. Successivamente la sospensione è stata addizionata di Trypan Blue (concentrazione finale 0.1%) e, dopo due minuti, è stata effettuata un'ulteriore lettura.

La stessa procedura è stata seguita utilizzando le cellule HepG2.

3.2.1.2 Microscopia Confocale

Per l'analisi al microscopio confocale, i condrociti primari sono stati seminati alla densità di 1×10^6 cellule per pozzetto su un vetrino copri oggetto opportunamente sterilizzato per trattamento con etanolo 70% e fiamma e adagiato sul fondo del pozzetto. Le cellule sono state trattate come descritto nel paragrafo 3.2.1.1. Dopo 24 ore di trattamento, le cellule sono state lavate due volte con PBS e mantenute per 20 minuti in una soluzione di paraformaldeide al 4% (p/v; Sigma) in PBS, necessaria per fissare le cellule. Dopo lavaggi successivi con PBS, il vetrino è stato montato su un vetrino portaoggetti sul quale è stata applicato un agente in grado di inibire i fenomeni di *quenching* (MOWIOL; Sigma). I campioni sono stati analizzati al microscopio confocale (modello Leica TCS SP2) utilizzando i filtri per il FITC.

3.2.2 Determinazione degli Effetti sul Ciclo Cellulare

Condrociti primari e cellule della linea HepG2 seminati ad una densità pari a 0.5×10^6 cellule/pozzetto, sono stati incubati con i polimeri non marcati ad una concentrazione pari all'1% (p/v). Dopo 24 ore di trattamento, le cellule sono state lavate due volte con PBS. Una parte delle cellule trattate e lavate, è stata centrifugata, fissata in etanolo 70% e mantenuta a

4°C. Un'altra parte è stata mantenuta in incubatore per permetterne la crescita per altre 24 e 48 ore, successivamente si è proceduto al fissaggio con etanolo 70%.

Prima dell'analisi del ciclo cellulare e del contenuto proteico, i campioni sono stati lavati dal fissativo e reidratati effettuando lavaggi successivi in PBS. I campioni sono stati quindi mantenuti un'ora a 4°C e, dopo centrifugazione, a ciascun *pellet* sono stati aggiunti 500 µL di una soluzione colorante in PBS. La soluzione colorante viene preparata addizionando, per 10 mL di volume finale, 1 mL di una soluzione di propidio ioduro (PI) (Sigma) 0.01% in PBS, 1 mL di una soluzione di fluoresceina isotiocianato (FITC) (Sigma) preparata diluendo di cento volte in PBS una soluzione madre di FITC allo 0.05% in etanolo assoluto e 400 µL di una soluzione acquosa di RNasi (1 mg/mL).

I campioni sono stati lasciati *over-night* a 4°C prima della lettura al citofluorimetro.

Dall'analisi citofluorimetrica, gli istogrammi FL3 sono stati elaborati per l'analisi del ciclo cellulare tramite il software MultiCycle®, mentre gli istogrammi FL1/FL3 sono stati analizzati con il software WinMDI (Dr. J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

Tutte le prove sono state condotte in duplicato.

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Per valutare il potere del Chitlac di interagire con cellule presentanti recettori per il galattosio, si è scelto di effettuare delle prove preliminari utilizzando una linea cellulare, HepG2, derivante da epatocarcinoma e dunque presentante numerosi recettori per il galattosio. In particolare, per evidenziare se il Chitlac venga internalizzato da una simile linea cellulare, si è deciso di utilizzare la proprietà del Trypan Blue (molecola non in grado di oltrepassare le membrane di cellule vitali) di dare fenomeni di *quenching* con la fluoresceina. Al trattamento di 24 ore con il Chitlac fluorescinato, sono seguiti lavaggi in PBS, per eliminare il polimero non legato, e distacco delle cellule dai pozzetti tramite *scraper*. L'utilizzo dello *scraper* al posto della tripsina si è reso necessario al fine di evitare l'alterazione delle proteine di membrana e dunque della permeabilità delle cellule. Le cellule così trattate sono state analizzate prima e dopo l'aggiunta dell'agente smorzante. In figura 3.1 è illustrato l'istogramma relativo alla fluorescenza delle cellule trattate con il polimero fluorescinato (istogramma verde) sovrimposto all'istogramma relativo alla fluorescenza delle cellule non trattate (istogramma vuoto). Si nota come la fluorescenza delle cellule aumenti di dieci volte con il trattamento, ad indicare un'effettiva interazione del Chitlac con le cellule HepG2. Il

trattamento con l'agente smorzante (*quencher*) ha permesso di stabilire la natura di tale interazione; esso infatti ha causato lo smorzamento del 20% della fluorescenza, ad indicare come l'80% di essa sia di tipo intracellulare. Pertanto si può affermare che l'80% del Chitlac che ha interagito con la cellula è stato internalizzato. In particolare, l'analisi relativa alle due diverse sotto-popolazioni cellulari ha evidenziato come la popolazione di cellule di dimensioni superiori (presumibilmente cellule metabolicamente più attive) presenti il Chitlac solo a livello intracellulare, mentre il polimero rimasto a livello extracellulare sia presente solo sulla superficie di cellule di dimensioni inferiori (presumibilmente quiescenti). E' ipotizzabile che lo stato metabolico cellulare influenzi l'*uptake* del Chitlac.

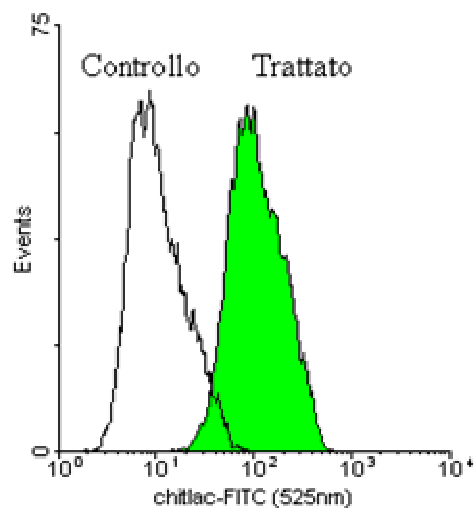


Figura 3.1. Fluorescenza di cellule HepG2. istogrammi FL1: in verde, cellule trattate con Chitlac 1% (p/v) per 24h; istogramma vuoto, cellule di controllo non trattate. MFI trattato = 10 x MFI cellule controllo.

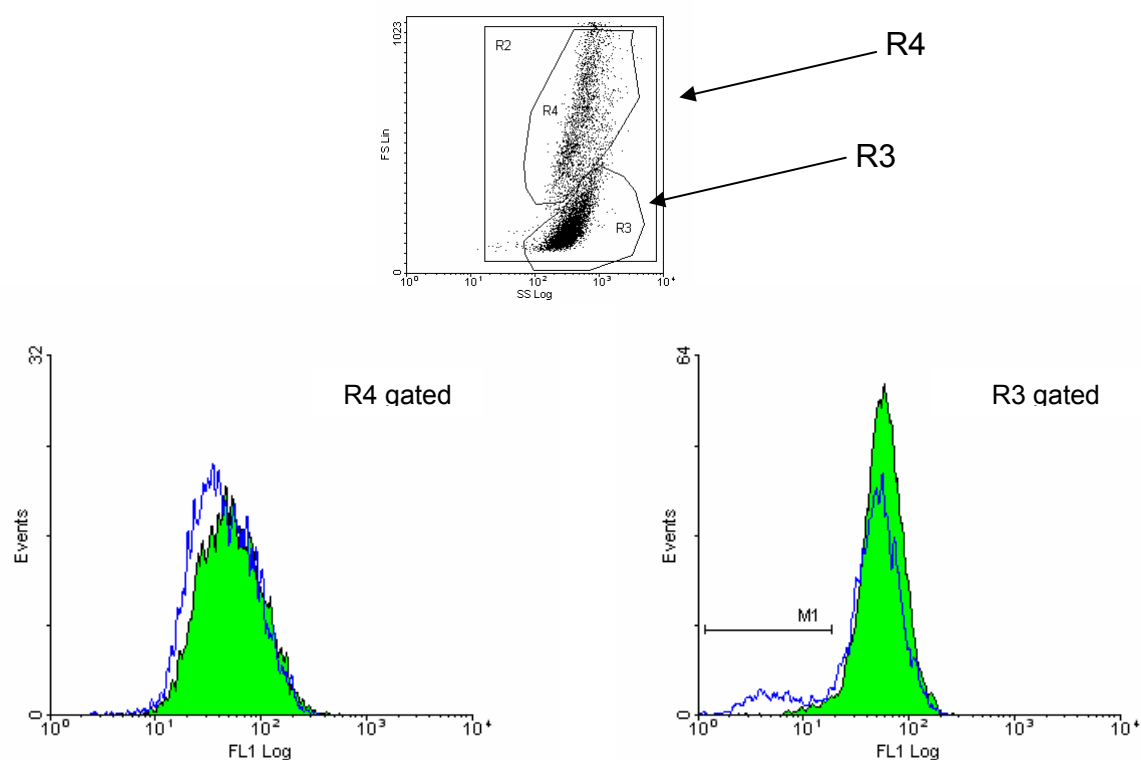


Figura 3.2. Fluorescenza delle sotto-popolazioni di HepG2. Sopra, distribuzione delle sotto-popolazioni in base ai valori di FS e SS. Sotto, istogrammi in verde: cellule trattate con Chitlac 1% (p/v) per 24h; istogrammi vuoti: istogrammi rilevati dopo breve incubazione con Trypan Blue. Pannello a sinistra: istogrammi relativi alle cellule appartenenti alla sotto-popolazione R4; pannello a destra: istogrammi relativi alle cellule appartenenti alla sotto-popolazione R3.

Una volta stabilito un effetto su cellule presentati una notevole quantità di recettori per il galattosio, lo stesso studio è stato effettuato su condrociti estratti dalla cartilagine articolare di maiali sani. Per poter meglio evidenziare la differenza di fluorescenza tra i condrociti trattati e non, sono stati effettuati i trattamenti anche utilizzando il Chitlac rodaminato. In figura 3.3 si nota come le cellule trattate presentino un netto incremento di fluorescenza, mentre l'incubazione con Trypan Blue porta ad uno smorzamento (*quenching*) della fluorescenza pari al 25% e corrispondente alla popolazione di cellule di piccole dimensioni.

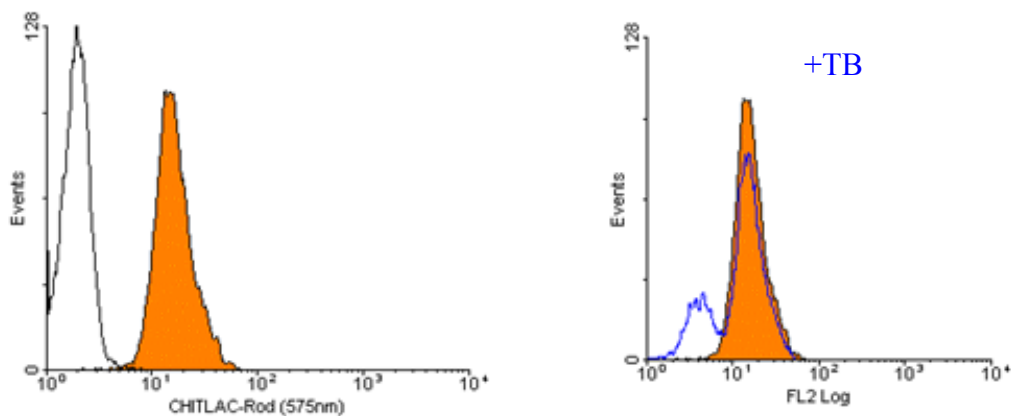


Figura 3.3. Fluorescenza delle sotto-popolazioni di condrociti. Istogramma rosso: cellule trattate con ChitlacRhod; istogramma nero vuoto: controllo; istogramma blu vuoto: cellule incubate con trypan blue dopo trattamento di 24h con ChitlacRhod.

Le analisi condotte alla microscopia confocale hanno confermato tali risultati (figura 3.4). In particolare, l'osservazione a diversi piani ha permesso di individuare la fluorescenza anche all'interno della cellula.

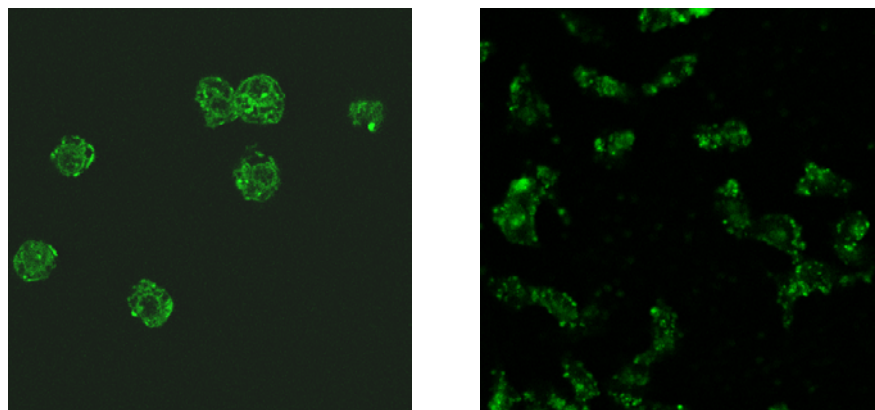


Figura 3.4. Immagini ottenute al microscopio confocale di cellule trattate con ChitlacFITC. A sinistra, condrociti, a destra, HepG2.

E' possibile concludere che il grado di internalizzazione del Chitlac dipende dalle dimensioni e, presumibilmente, dall'attività metabolica delle cellule trattate.

Esperimenti precedentemente condotti nel laboratorio del Professor Paoletti (Mozetic, 2007; Marsich, 2008) hanno portato a concludere che condrociti da coltura primaria di maiale incapsulati in matrici miste di alginato/Chitlac presentano un'aumentata proliferazione ed un incremento della sintesi di proteoglicani. Il nostro interesse si è dunque rivolto all'analisi di

possibili effetti del trattamento con il polimero sul ciclo cellulare sia di cellule sane sia trasformate.

A tale scopo, gli esperimenti, sono stati condotti sia sulla linea cellulare HepG2 (come modello di cellula tumorale), che su condrociti primari, quale modello di cellula sana.

Dopo un trattamento di 24h (in terreno completo), le cellule sono state lavate e successivamente lasciate crescere per altre 24h e 48h. L'analisi dei cicli cellulari ha evidenziato una perturbazione della progressione nel ciclo cellulare in entrambi i tipi cellulari ed in particolare nella linea HepG2 (figura 3.5). Inoltre, se i condrociti presentano solo un certo incremento della popolazione in fase di sintesi dopo le 24h di trattamento (figura 3.8), nella linea HepG2, oltre alla variazione delle popolazioni nelle diverse fasi del ciclo, si nota la comparsa di una popolazione apoptotica 48h dal *washout* (figura 3.6 e figura 3.7).

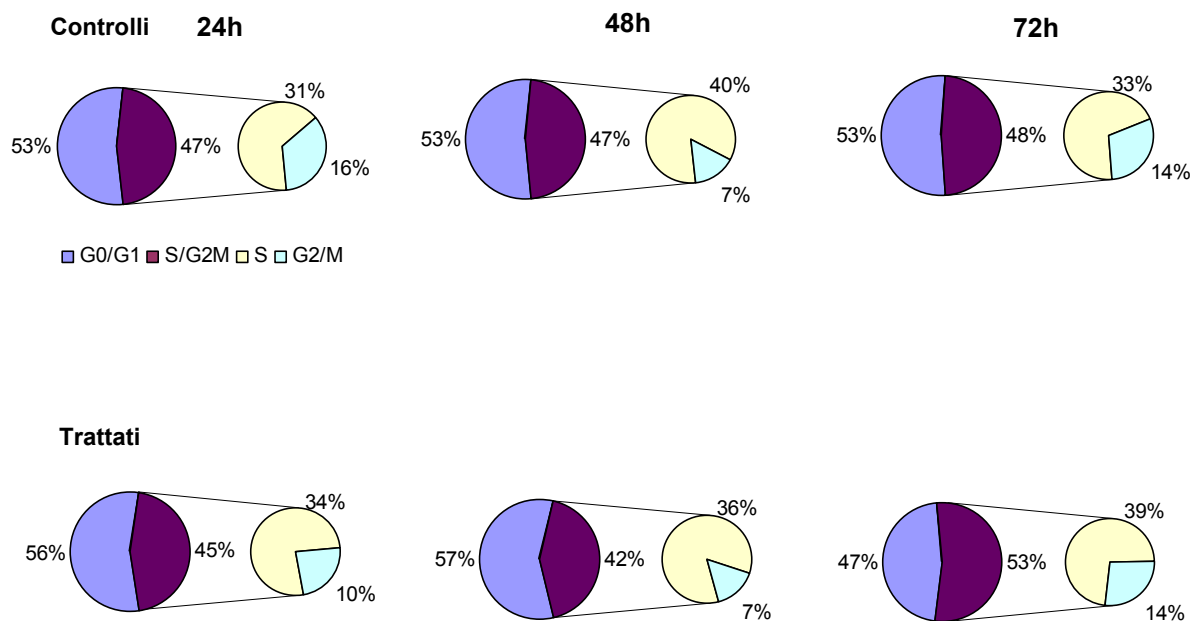


Figura 3.5. Rappresentazione tramite grafico a torta della variazione delle percentuali delle popolazioni di HepG2 nelle fasi del ciclo cellulare. Sopra, controlli; sotto, trattati con Chitlac 1% (p/v) per 24h. La scala temporale si riferisce alle ore dall'inizio del trattamento.

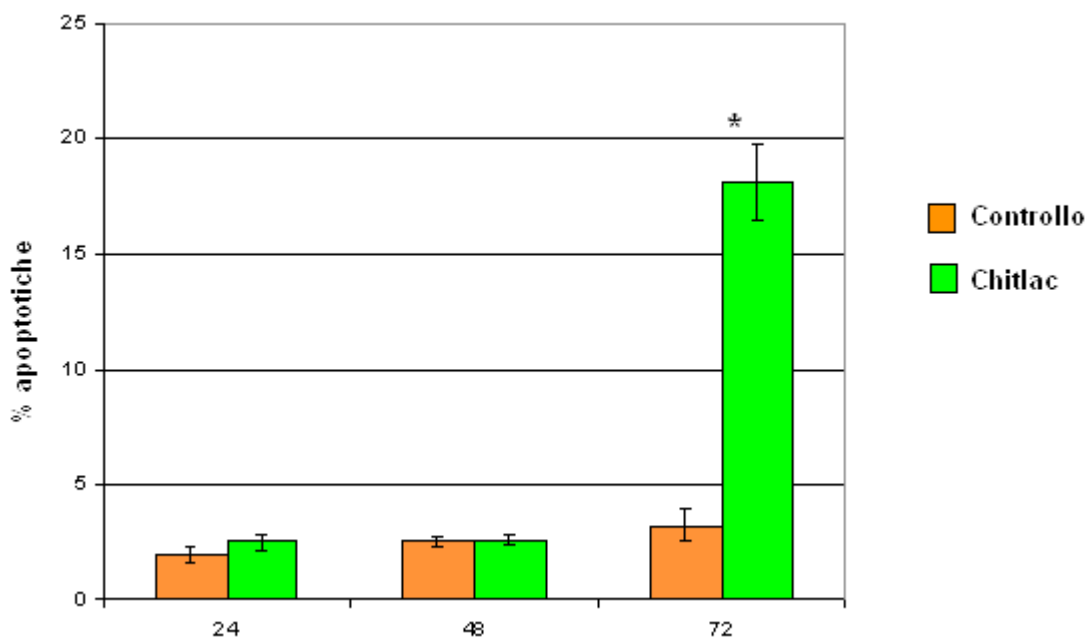


Figura 3.6. Rappresentazione con grafico a barre della percentuale di cellule HepG2 apoptotiche a 24, 48 e 72 ore.

*valore statisticamente diverso dal controllo; ANOVA unpaired t-test.

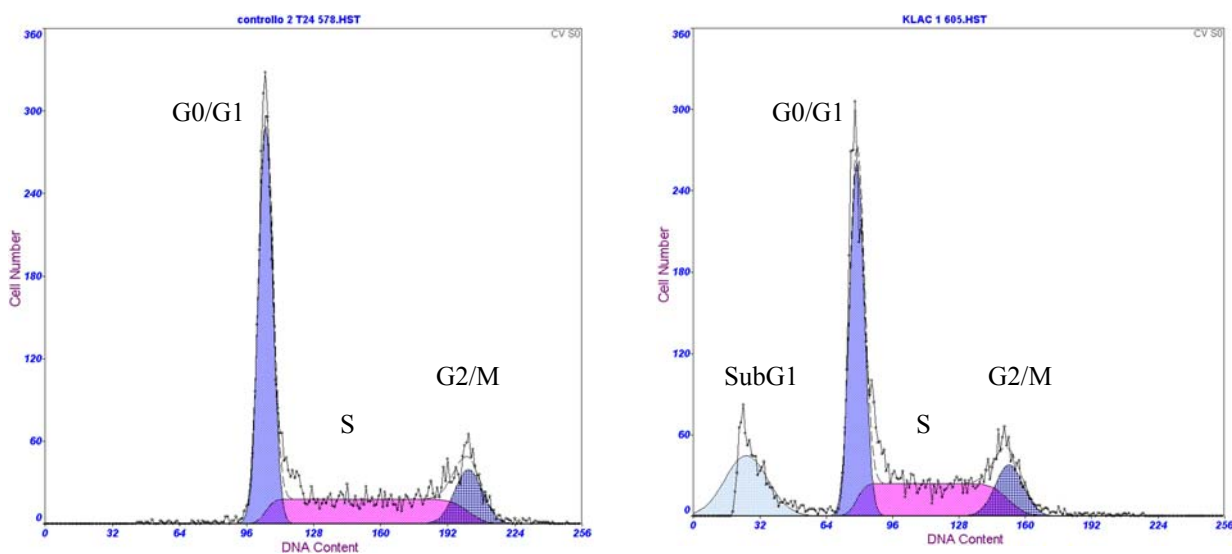


Figura 3.7. Rappresentazione ad istogramma delle popolazioni cellulari nelle diverse fasi del ciclo dopo 72 h. A sinistra controlli, a destra, trattati.

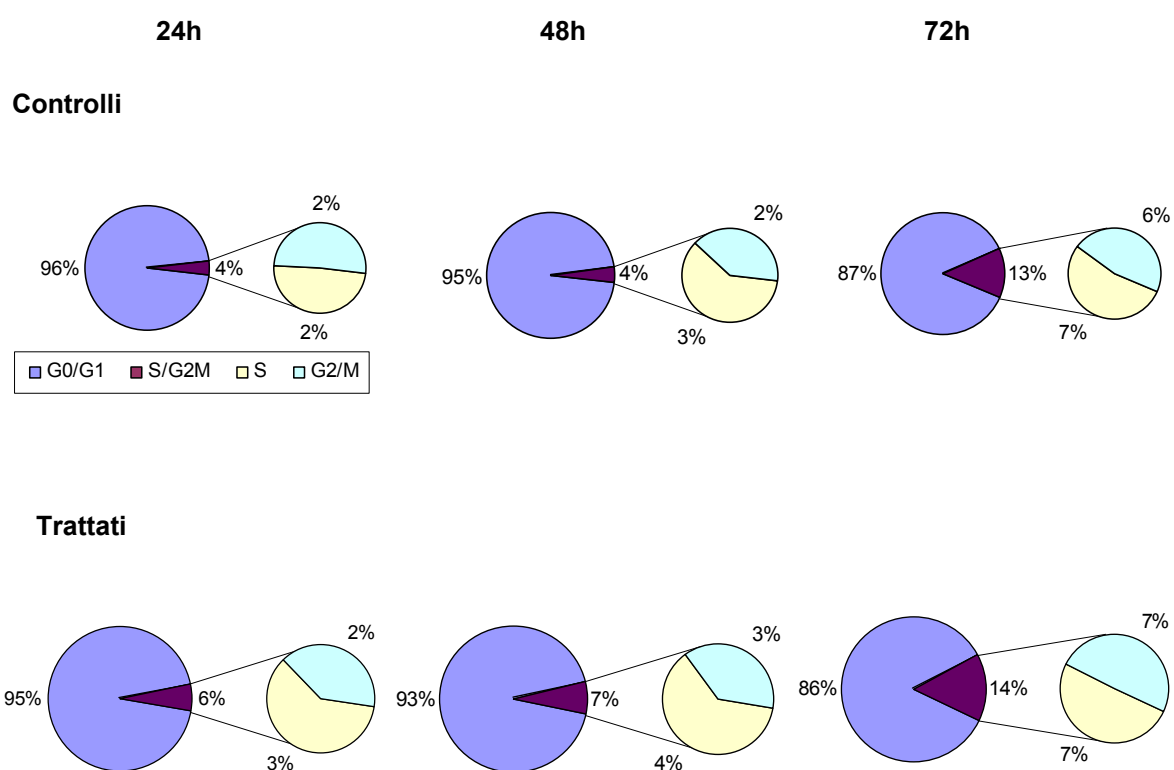


Figura 3.8. Rappresentazione mediante grafico a torta della variazione delle percentuali delle popolazioni di condrociti nelle fasi del ciclo cellulare. Sopra, controlli; sotto, trattati con Chitlac 1% (p/v) per 24h. La scala temporale si riferisce alle ore dall'inizio del trattamento.

3.4 CONCLUSIONI

Dalle prove di internalizzazione tramite l'utilizzo del fenomeno del *quenching* è possibile concludere che l'*uptake* del Chitlac da parte delle cellule risulta avvenire sia in un modello cellulare patologico ad alta proliferazione (HepG2) che in cellule estratte da cartilagine sana. Inoltre, dalle preliminari analisi del ciclo cellulare si è potuto evidenziare un diverso effetto del polimero a seconda della linea cellulare trattata. Il trattamento dei condrociti con Chitlac 1% (p/v) ha portato ad un incremento complessivo delle cellule in fase di sintesi e divisione cellulare. Inoltre, non è stato riscontrato alcun effetto pro-apoptotico da parte del Chitlac su questo tipo di cellule, che ricordiamo essere una coltura primaria da animali sani. Tale dato è in accordo con i risultati ottenuti nei nostri laboratori (Marsich, 2008) nei quali si osservava un incremento della proliferazione dei condrociti incapsulati in matrici miste di Chitlac/alginato e alcun effetto pro-apoptotico anche dopo 17 giorni.

Il trattamento di cellule HepG2, derivanti da epatocarcinoma umano, ha evidenziato inizialmente una perturbazione del ciclo cellulare e, dopo 48h dal *washout* delle cellule, un incremento statisticamente significativo (T/C pari a 5,7) della popolazione di cellule apoptotiche.

Le evidenze da noi riscontrate ci inducono ad ipotizzare che il Chitlac riesca ad essere internalizzato nei due modelli cellulari considerati, e, una volta entrato possa modulare il ciclo cellulare in relazione alle condizioni fisio/patologiche delle cellule trattate.

Relazionando tali eventi con l'interazione tra galectine e Chitlac da noi dimostrata (**Capitolo 2**) è ipotizzabile che gli effetti osservati nelle cellule possano dipendere dall'interazione tra il polisaccaride e le galectine, essendo queste ultime proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare ed espresse in modo alterato nelle cellule tumorali (si riveda il capitolo III dell'**Introduzione Generale**) (figura 3.9).

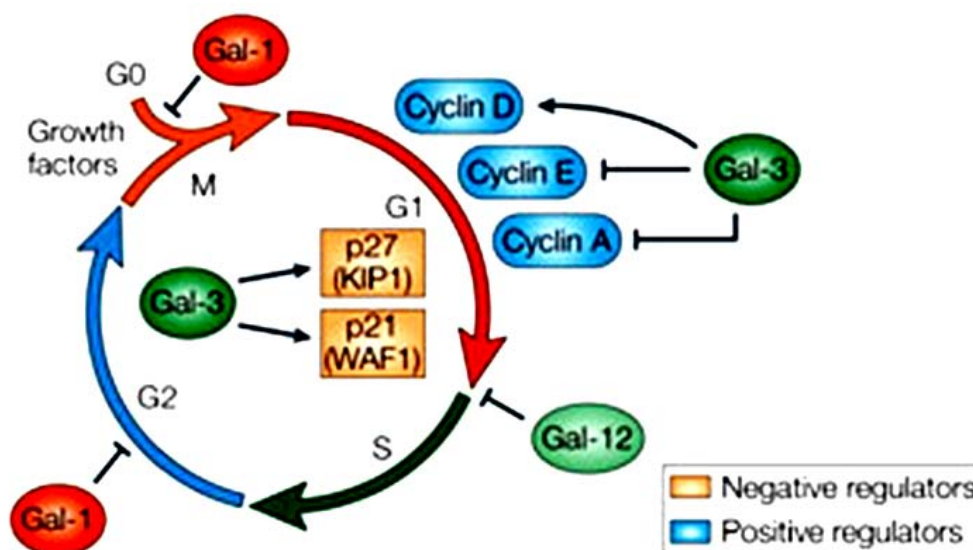


Figura 3.9. Punti di controllo del ciclo cellulare da parte delle galectine.

Per una migliore comprensione di tali eventi, risulta chiaro che si dovrà approfondire lo studio dell'interazione del Chitlac con le galectine all'interno di un sistema cellulare. In particolare, studi di colocalizzazione tramite citofluorimetria e microscopia confocale potranno

confermare il legame del Chitlac alle galectine “*in vivo*” e indicare se sia questo legame ad influenzare il ruolo svolto dalle galectine nella regolazione dei fenomeni apoptotici. Ipotizzando che il legame Chitlac-galectina avvenga a livello citosolico, è altrettanto ipotizzabile che tale legame possa impedire alla proteina di entrare nel nucleo per svolgere le sue funzioni a livello trascrizionale. Un effetto di questo tipo potrebbe spiegare la comparsa del picco apoptotico solo dopo 72 ore dal trattamento, ad indicare un probabile progressivo sequestro delle galectine citosoliche.

PARTE B

ANALISI DELLE PATOLOGIE ARTICOLARI A LIVELLO TISSUTALE:

**Valutazione delle Potenzialità di Sistemi Galattosilati in
Diagnostica**

CAPITOLO 4

TECNICHE DIAGNOSTICHE PER IMMAGINI

4.1 INTRODUZIONE

Le tecniche di diagnostica per immagini più usate per lo studio dell'artrite reumatoide sono la risonanza magnetica (MRI) e l'*imaging* ottico.

La risonanza magnetica permette l'individuazione precoce di modifiche alle ossa e al tessuto molle nell'artrite reumatoide; attualmente è considerato il mezzo d'elezione per la valutazione di questa patologia (Burstein, 2003).

Questa tecnica consente infatti la visualizzazione dei sinoviociti con alta sensibilità grazie all'utilizzo di sonde a base di gadolinio, che permettono anche la distinzione tra l'infiammazione del tessuto molle ed i versamenti articolari (Biswal, 2007).

L'*imaging* ottico si avvale invece dell'utilizzo di particolari sonde fluorescenti che possono essere rilevate a basse concentrazioni e di radiazioni non ionizzanti, sicure per l'individuo. Sonde per l'*imaging* ottico sono state inoltre coniugate a piccole molecole, anticorpi e proteine, per avere una maggiore specificità. Lo sviluppo di questa tecnica è stato fortemente incentivato dai nuovi strumenti ottici messi a punto negli ultimi decenni, che hanno contribuito ad aumentare il numero di applicazioni dell'*imaging* ottico in diagnostica. Questa tecnica, rispetto ad altre più consolidate, presenta l'indubbio vantaggio di essere poco costosa e di usare strumenti di ridotte dimensioni, risultando dunque particolarmente versatile (Biswal, 2007).

Entrambe queste tecniche si avvalgono di tre tipi di probe:

a. Agenti di contrasto non-specifici:

Questa classe di composti ha una distribuzione compartimentale e non interagisce con uno specifico target molecolare. Nell'artrite reumatoide, la sinovia delle giunture infiammate mostra un aumentato numero di capillari e una maggior perfusione e permeabilità vascolare. Perciò, dopo un'iniezione intravenosa possono essere individuate quantità maggiori di mezzo di contrasto nella sinovia artritica rispetto a quella sana e ai tessuti circostanti. E' stato dimostrato che vi è una correlazione tra la velocità e l'intensità del segnale di MRI dopo

infusione intravenosa di Gd-DTPA (Magnevist®) ed il progresso della malattia ed inoltre è sensibile a miglioramenti dovuti alle terapie seguite.

Lo stesso principio è stato usato nella diagnosi dell'osteoartrite. Gli stadi precoci di questa malattia sono caratterizzati dalla perdita del collagene della matrice extracellulare della cartilagine e da una sostanziale perdita di glicosamminoglicani. La malattia prosegue quindi con lo sviluppo di anomalie anatomiche che comprendono edema, fibrillazione, fessurazione, frammentazione e denudamento della cartilagine. L'MRI, pur essendo la tecnica più indicata per l'indagine di questa patologia, non è ancora in grado di riconoscere i primissimi stadi della malattia. In uno studio riportato in letteratura, i glicosamminoglicani vengono utilizzati come *marker* della malattia: queste molecole, contenendo un gran numero di gruppi carichi negativamente, respingono dalla cartilagine normale sonde che siano anch'esse cariche negativamente, come il GdDTPA²⁻. Questa parziale esclusione non avverrebbe invece nel caso di un ginocchio affetto da osteoartrite, dove i GAGs sono meno presenti proprio per effetto della malattia (Burstein, 2003).

b. Agenti specifici

Queste molecole vengono create legando chimicamente il mezzo di contrasto a una molecola recettore-specifica, come un anticorpo, un peptide, una molecola o un costrutto multivalente. Nel caso dell'artrite reumatoide, questo tipo di costrutti può essere usato per valutare l'espressione e la distribuzione di recettori (es. recettori per le citochine) coinvolti nella malattia.

Un esempio è dato dal recettore del folato (FR), proteina che lega l'acido folico con alta affinità (Chen, 2005). Ad eccezione dei reni e della placenta, i normali tessuti esprimono quantità bassissime di questo recettore. E' stato dimostrato che una delle isoforme del recettore viene espressa dai macrofagi sinoviali attivati e non dagli altri. La derivatizzazione del folato può essere perciò utilizzata per mandare a bersaglio i macrofagi attivati coinvolti nella malattia infiammatoria.

c. Smart probes

Gli "*smart probes*" quando iniettati sono quasi invisibili, poi subiscono delle modifiche, dovute all'interazione con un recettore o un enzima, che li rendono visibili all'MRI o all'*imaging* ottico. Nell'artrite reumatoide queste sonde possono essere usate per monitorare l'attività di enzimi che degradano la matrice, come le metalloproteasi e le catepsine.

E' stata riportata la sintesi di sonde fluorescenti che subiscono fenomeni di *quenching* finché

non vengono attivati dalle proteasi presenti sul sito dell'inflammatione (es. cathepsine-specifiche) (Wunder, 2004).

Di seguito (Tabella 4.1) si riporta un riassunto delle diverse tecniche di immagine in uso, con particolare riferimento al *target* pato-fisiologico (Biswal, 2007).

Tabella 4.1

Targeted Pathophysiology or Technique	Temporal Pattern	Modality and Specific Methods*	Clinical or Preclinical Study
T cell infiltration	Hyperacute to acute	Nuclear medicine: ^{99m} Tc-HMPAO-labeled T cells PET reporter genes Optical imaging: luciferase reporter genes MR imaging: CLIO-Tat	Clinical Preclinical Preclinical Preclinical
Antibody-based imaging	Hyperacute to chronic	Nuclear medicine: ⁶⁴ Cu-labeled anti-GPI ¹¹¹ In- or ^{99m} Tc-labeled nonspecific IgG ^{99m} Tc-labeled anti-CD3 ^{99m} Tc-labeled anti-CD4 ¹¹¹ In- or ^{99m} Tc-labeled anti-E-selectin Fab Radiolabeled anti-tumor necrosis factor α , anti-interleukin-1, anti-interleukin-2, anti-interleukin-6 ¹²³ I-antileukoproteinase ^{99m} Tc-labeled anti-CD15 immunoglobulin M Optical imaging: NIRF-labeled anti-F4/80 macrophage surface antigen	Preclinical Clinical Clinical Clinical Clinical Preclinical Clinical Preclinical
Macrophage recruitment	Hyperacute to chronic	MR imaging: SPIO particles Ultrasmall SPIO particles Nuclear medicine: ^{99m} Tc-folic acid (folate receptor imaging agent) Optical imaging: NIRF-labeled folate	Clinical Preclinical Preclinical Preclinical
Leukocyte recruitment	Hyperacute to chronic	Nuclear medicine: ^{99m} Tc-HMPAO-labeled WBCs ¹¹¹ In-labeled WBCs ⁶⁷ Ga-citrate	Clinical Clinical Clinical
Cytokine production	Hyperacute to chronic	Nuclear medicine: ¹²³ I-labeled interleukin-1 receptor antagonist	Clinical
Matrix-degrading enzymes	Hyperacute to chronic	Optical imaging: cathepsin- and matrix metalloproteinase-sensitive NIRFs	Preclinical
Synovitis and/or tenosynovitis	Acute to chronic	US: gray-scale power Doppler MR imaging: nonenhanced and gadolinium-enhanced imaging	Clinical Clinical
Joint effusion	Acute to chronic	US MR imaging Radiography	Clinical Clinical Clinical
Soft-tissue swelling	Acute to chronic	US MR imaging Radiography	Clinical Clinical Clinical
Bone marrow changes	Acute to chronic	MR imaging Nuclear medicine: ^{99m} Tc-methylene diphosphonate	Clinical Clinical
Increased metabolism	Acute to chronic	Nuclear medicine: ¹⁸ F-FDG PET	Clinical
Cell stress/apoptosis	Acute to chronic	Nuclear medicine: ^{99m} Tc-, ¹²³ I-, ¹²⁴ I-, ¹²⁵ I-, ¹⁸ F-, ¹¹ C-, ⁶⁴ Cu-, ⁶⁷ Ga-, ⁶⁸ Ga-labeled annexin V MR imaging: CLIO-labeled annexin V Optical imaging: Cy5.5-labeled annexin V	Clinical trials for variety of applications Preclinical Preclinical
Vascular inflammation and angiogenesis	Acute to chronic	US: power Doppler MR imaging: gadolinium-enhanced MR imaging	Clinical Clinical
Osseous or cartilaginous erosions	Intermediate to chronic	Radiography CT MR imaging	Clinical Clinical Clinical
Tendon damage	Intermediate to chronic	US MR imaging	Clinical Clinical
Subluxations and dislocations	Chronic	Radiography CT MR imaging	Clinical Clinical Clinical
Secondary OA	Chronic	Radiography CT MR imaging	Clinical Clinical Clinical

E' evidente che l'utilizzo di analisi in ambito sierico potenzialmente in grado di offrire elevata sensibilità e specificità nelle fasi più precoci della malattia sarebbe altamente auspicabile, essendo un sistema poco invasivo, che non richiede l'uso di strumentazione costosa o

ingombrante e comporterebbe minori spese sanitarie. Tuttavia, a tutto oggi non possiamo ritenere di avere a disposizione un singolo esame di laboratorio il cui risultato possa di per sé avere valore diagnostico assoluto e soprattutto predittivo in termini di sviluppo di aspetti invalidanti, erosivi, di malattia infiammatoria sinoviale.

Per questo motivo è di fondamentale importanza ricercare un fattore che possa permettere l'individuazione della patologia fin dai primi stadi del suo sviluppo e con una accuratezza, anche data dall'individuazione degli specifici siti colpiti, che possa permettere una corretta diagnosi e prognosi.

A tal fine, nel corso di questo progetto di Dottorato, ci si è posti come obiettivo lo sviluppo di mezzi diagnostici dotati di elevata specificità, in grado di essere veicolati nel solo sito di sviluppo dell' infiammazione reumatica e con *pattern* di distribuzione e sensibilità tali da individuare i diversi livelli di attività infiammatoria della malattia. Tale approccio è di fondamentale importanza anche nell'ottica dello sviluppo di nuove terapie che siano atte a modificare non solo i sintomi bensì anche e soprattutto i processi patogenetici di origine della malattia.

La galectina-3, nostro *target* principale, è stata individuata anche nel plasma, indicando il suo potenziale uso come *biomarker* sanguigno per la patologia (Shou, 2006), restando comunque un ottimo bersaglio per sonde diagnostiche che permetterebbero l'individuazione del sito specifico in cui si ha l'evoluzione della patologia.

4.1.1 Risonanza Magnetica Nucleare

Dal punto di vista del medico radiologo un miglior contrasto tra tessuti o organi sani e malati è sicuramente un valore aggiunto alla stessa diagnosi. Tale miglioramento è ottenibile per esempio somministrando una sostanza esogena nota come mezzo di contrasto.

In risonanza magnetica nucleare (MRI) tali sostanze possono includere complessi paramagnetici noti per la loro capacità di alterare la rilassività dei protoni dell'acqua presente nei tessuti sotto esame, qualora tali protoni siano sottoposti a campo elettromagnetico esterno.

La rilassività è una proprietà intrinseca di complessi paramagnetici e che caratterizza la loro capacità di incrementare la velocità di rilassamento nucleare di protoni vicinali (Figura 4.1).

Un'elevata velocità di rilassamento può comportare un incremento del contrasto e dunque un miglioramento della qualità dell'immagine, permettendo quindi al medico di ottenere informazioni fisiologiche in tempi brevi, a vantaggio dell'accuratezza dell'indagine e dei costi.

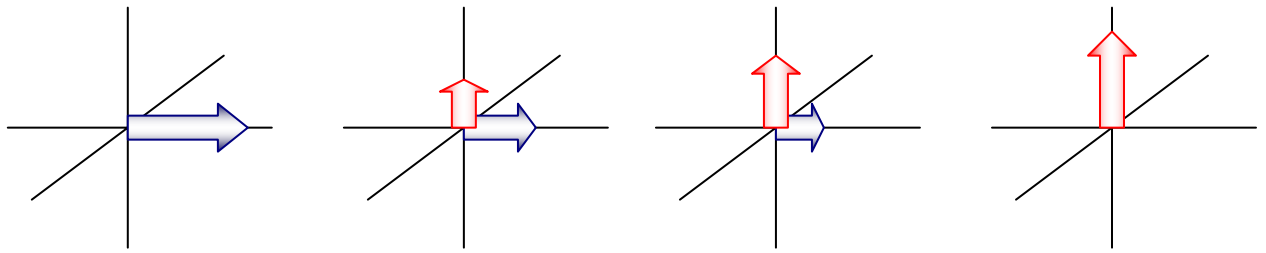


Figura 4.1. Rappresentazione schematica del tempo di rilassamento. In rosso, è rappresentato il ripristino del momento di magnetizzazione lungo l'asse z (T_1); in blu, è rappresentata la perdita del momento di magnetizzazione lungo il piano xy (T_2).

Tipicamente, gli agenti di contrasto per MRI includono uno ione metallo paramagnetico opportunamente chelato. Gli ioni paramagnetici più utilizzati in MRI si trovano nella serie dei metalli di transizione o nella serie dei lantanidi.

Per quanto riguarda i lantanidi, l'attenzione è focalizzata in particolare sullo ione gadolinio sia per il suo paramagnetismo (7 elettroni spaiati) che per le sue proprietà favorevoli in termini di rilassamento elettronico.

Questo ione metallico viene necessariamente somministrato in forma complessata da parte di un ligando chelante essendo il gadolinio uno ione estremamente tossico quando presente in forma libera. La scelta del ligando è di fondamentale importanza in quanto deve provvedere a formare un complesso che sia termodinamicamente e cineticamente stabile, mantenendo allo stesso tempo le proprietà ottimali di rilassività.

Gli ioni paramagnetici vengono generalmente chelati da ligandi poliamminocarbossilici lineari o ciclici. Allo stato dell'arte diversi complessi di ligandi poliamminopolicarbossilici lineari e ciclici con ioni paramagnetici sono utilizzati come agenti di contrasto per MRI.

Tra i più comuni si trovano l'acido dietilentriamminopentacetico (DTPA) e l'acido 1,4,7,10-tetracetico (DOTA). La stabilità dei complessi formati tra questi leganti e lo ione gadolinio è tale da impedire il rilascio dello ione Gd^{3+} , molto tossico, libero nell'organismo. Tuttavia, date le loro dimensioni molecolari, tali complessi vengono escreti rapidamente in quanto presentano una biodistribuzione extracellulare aspecifica.

Per tale motivo la ricerca di nuovi mezzi di contrasto si è focalizzata sul legame di Gd-DTPA²⁻ e Gd-DOTA⁻ a macromolecole biocompatibili capaci di incrementare la specificità del complesso di gadolinio verso un particolare target (Rebizak, 1998).

La gran parte dei mezzi di contrasto per MRI presenti sul mercato sono certamente in grado di dare un segnale efficace, ma la mancanza di bio-specificità potrebbe avere importanti conseguenze sulla riduzione della dose e/o il miglioramento della qualità dell'immagine.

E' stato suggerito che la bio-specificità dei mezzi di contrasto a base di gadolinio potrebbe essere ottenuta apportando delle opportune modifiche chimiche alla struttura del ligando stesso, per esempio accoppiando Gd-DTPA²⁻ con un anticorpo monoclonale (Shahbazi-Gahrouei, 2001).

Questo non è un compito facile, poiché l'intorno chimico del gadolinio potrebbe determinare un calo di rilassività che, tuttavia, potrebbe essere controbilanciato da un incremento della specificità tissutale, permettendo quindi la somministrazione di dosi inferiori di mezzo di contrasto e la riduzione del rumore di fondo.

La presenza di unità saccaridiche sulla superficie cellulare di certi tessuti o organi è comunemente nota. Inoltre, proteine in grado di legare in modo specifico gli zuccheri, le lectine, svolgono numerosi ruoli (interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, come già ampiamente discusso nell'*Introduzione Generale* della presente tesi) (Asayama, 2004; Burtea, 2003; Marcon, 2005; Lis, 1998; Davis, 2002; Haltiwanger, 1986). Per tale motivo le interazioni zuccheri-lectine potrebbero essere sfruttate nella diagnosi e/o terapia di patologie caratterizzate da alterazioni dell'espressione di lectine, sviluppando probe diagnostici o farmaci costituiti da unità saccaridiche (Andrè, 2004).

I tumori per esempio sono patologie in cui è possibile riscontrare variazioni nell'espressione di lectine. In particolare, una sovraespressione di galectina-3 è presente in numerose patologie neoplastiche, come nei tessuti follicolari neoplastici della tiroide (Inohara, 1999), nei glioblastomi (Elad-Sfadia, 2004), nei tumori polmonari a piccole cellule (Pugliesi, 2004), in carcinomi mammari (Khaldoyanidi, 2003), tumori pancreatici (Berberat, 2001) e adenocarcinomi del colon (Huflejt, 1997). La galectina-3 è anche coinvolta nell'esacerbazione dell'artrite reumatoide (si veda il capitolo III.3), mentre la galectina-4 sembra ampiamente correlata con le patologie infiammatorie intestinali (rettocolite ulcerosa e morbo di Chron) (Hokama, 2004).

Altre interazioni coinvolgono il β -galattosio: un recettore (ASGP-R), localizzato sulla superficie della membrana cellulare, riconosce le asialoglicoproteine portanti un terminale β -

galattosidico (Asayama, 2004; Kobayashi, 1994). In questo contesto, Asayama e collaboratori hanno dimostrato che, quando Mn-porfirine sono coniugate con il lattosio, si osserva un incremento di tre volte del loro riconoscimento sulle cellule HepG2 grazie alle interazioni tra lattosio e recettori per le asialoglicoproteine espresse sulla superficie di cellule epatiche.

Alcuni oligosaccaridi sono noti interagire con enzimi specifici che possono essere sotto- o sovra-espresi in alcune patologie (Aime, 2002).

Le interazioni lectina-zucchero potrebbero dunque essere utilizzate nella diagnosi e/o terapia di patologie che comportino l'alterazione dell'espressione delle lectine utilizzando sostanze contenenti degli specifici carboidrati (André, 2004).

Aime e co-autori, nel loro lavoro del 2002, riportano alcune interessanti applicazioni di sonde paramagnetiche *targetted*. In particolare risulta innovativo l'utilizzo di Gd-HPDO3A, un legante contenente un'unità β -galattosidica, soggetta all'azione della β -galattosidasi. Quando l'unità β -galattosidica viene rimossa enzimaticamente *in vivo*, il segnale diagnostico aumenta permettendo di individuare l'eventuale sovra-espressione della β -galattosidasi.

Sono stati fatti diversi altri tentativi di legare zuccheri biologicamente attivi a ligandi per cationi paramagnetici (Asayama, 2004; André, 2004; Burtea, 2003; Aime, 2002); tali strategie hanno coinvolto diverse procedure sintetiche che sono estremamente laboriose in termini di tempo e implicano spesso modificazioni strutturali sulla stessa unità saccaridica, con conseguente perdita dell'attività biologica del mezzo di contrasto.

Certamente, scegliendo condizioni di reazione che non alterino il *core* biologicamente attivo dell'unità saccaridica, è possibile ottenere complessi metallici che abbiano le stesse interazioni biologiche dei carboidrati ad essi legati.

La strategia di coniugazione più usata implica la formazione di legami ammidici (-CONH- oppure -NHCO-), benché occasionalmente siano stati descritti legami tio-eteri ed esterei (André, 2004; Baia, 2005; US 4822594; EP 0707857; WO 99/01160).

Scegliendo un legame amminico, si utilizza una strategia sintetica semplice sfruttando l'estremità riducente degli zuccheri che mantengono la loro attività biologica. Inoltre, l'aumento dell'idrofilicità da parte delle unità saccaridiche legate potrebbe aumentare la rilassività del mezzo di contrasto.

4.1.2 *Imaging Ottico*

L'*imaging* ottico di piccoli animali sta diventando una tecnica di grande rilevanza per la scienza farmacologica. Questo strumento, tramite l'utilizzo di sonde fluorescenti può fornire certamente informazioni valide sulla specificità e l'efficacia di nuovi farmaci.

L' *imaging* ottico con ausilio dei *probe* fluorescenti trova una specifica applicazione nello studio di modelli sperimentali animali di artrite reumatoide ed è in continua evoluzione come nuova metodica per la diagnosi precoce della patologia. Esso permette di visualizzare l'infiammazione di tessuti molli prima che si rendano evidenziabili lesioni delle strutture ossee adiacenti esaminabili con le comuni tecniche radiografiche (Wunde, 2005 e 2004).

L'esame dell'infiammazione dei tessuti può essere effettuato utilizzando *probe* fluorescenti che esaltano dal punto di vista del contrasto radiografico i tessuti infiammati rispetto ai tessuti sani. (Hansch, 2004; Bremer, 2003). Al momento non esistono ancora in commercio mezzi di contrasto specifici per l'artrite reumatoide per nessuna delle tecniche diagnostiche comunemente impiegate nella pratica clinica.

Inoltre, lo sviluppo di sistemi di *imaging* ottico per uso clinico dedicati all'*imaging* del sistema muscolo-scheletrico ed osteo-articolare può essere una valida alternativa sia per i costi di gestione ed esame sia dal punto di vista della sicurezza rispetto a metodiche invasive che prevedono radiazioni ionizzanti.

Da un punto di vista spettroscopico, il fenomeno coinvolto è l'interazione tra le radiazioni non ionizzanti prodotte da laser a bassa intensità e i tessuti del paziente, che genera l'emissione di un segnale, a sua volta catturato da un rivelatore (*detector*). Per quanto riguarda l'*imaging in vivo* è preferibile visualizzare i fotoni emessi nel vicino infrarosso (NIR) poiché i tessuti presentano un limitato assorbimento della luce con lunghezza d'onda compresa tra i 650 e i 1100 nm; in tal modo la luce può penetrare all'interno del tessuto per alcuni centimetri.

I fotoni nel NIR, viaggiando attraverso i tessuti vengono ampiamente dispersi prima di essere totalmente assorbiti dal tessuto o emessi sulla superficie del tessuto da dove vengono rilevati. Poiché i fotoni dispersi non hanno una direzione o un orientamento preferenziale è possibile differenziare statisticamente un fotone dall'altro osservando il tempo necessario per emergere dal mezzo in cui si disperdono. Tale fenomeno è noto come *Time Domain* (TD).

L'*imaging* molecolare permette di misurare o visualizzare specifiche molecole e *pathway* molecolari *in vivo*. Si possono ottenere informazioni riguardo processi fisiologici a livello molecolare, diversamente da quanto accade con le immagini anatomiche (come raggi X o MRI), da cui si ottengono informazioni strutturali.

La tecnica dell'*imaging* molecolare necessita dell'utilizzo di mezzi di contrasto esogeni; a tal fine si usano solitamente molecole in grado di interagire con strutture intrinseche nell'individuo analizzato (per esempio anticorpi), coniugate con altre molecole sonda in grado di essere visualizzate.

Per generare un contrasto nell'*imaging* ottico si utilizzano marcatori fluorescenti. I *probe* ottici sono molecole sicure per l'organismo, che possono essere ottenuti coniugando un fluoroforo ottico con una molecola di interesse.

Durante l'*imaging* TD, brevi impulsi di luce vengono inviati per illuminare il campione, il sistema quindi rileva i fotoni in base al loro tempo di volo all'interno del tessuto. La distribuzione del tempo di volo viene utilizzata come informazione per ottenere le caratteristiche ottiche del campione, discriminando tra assorbimento e proprietà dispersive. Tale dispersione fornisce anche informazioni per quanto concerne l'*imaging* di patologie e di processi fisiologici: tessuti normali e patologici infatti disperdono la luce in maniera differente.

Con l'*imaging* TD si ottengono informazioni riguardanti il materiale fluorescente, la localizzazione in termini di profondità del materiale e la sua concentrazione. È possibile inoltre ottenere immagini topografiche tridimensionali nonché informazioni riguardanti il tempo di vita del *probe* fluorescente. Quest'ultimo aspetto permette di discriminare tra diversi materiali fluorescenti. Variazioni delle proprietà del tessuto, come pH, livelli di ossigeno e calcio, inducono una variazione del tempo di vita del *probe*, permettendo dunque di individuare tali variazioni.

Il sistema è costituito da una sorgente di luce laser, la cui emissione può essere variata tra 405-440 nm e 630-900 nm, un *detector* sensibile nella banda spettrale compresa tra 450 e 900 nm, mentre una videocamera permette di monitorare costantemente l'animale.

Il sistema è schematicamente rappresentato in Figura 4.1: l'animale viene adagiato su un tavolino e si seleziona la regione di interesse tramite l'uso della telecamera (dal manuale eXplore Optics).

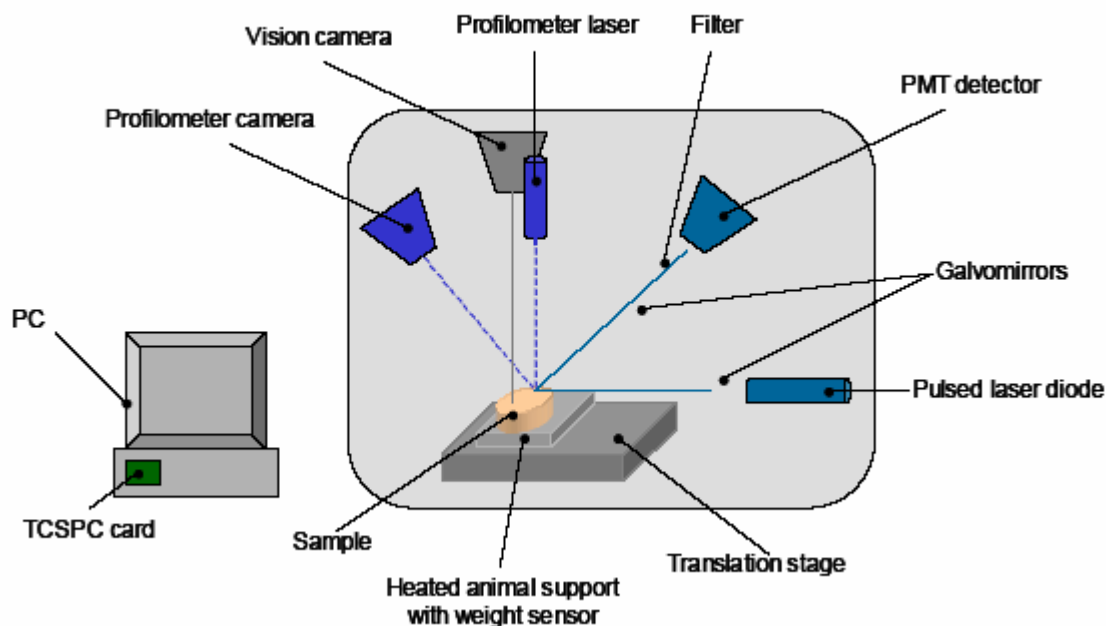


Figura 4.2. Schema dello strumento eXplore Optix. TCSPC= sistema per il conteggio a singolo fotone correlato nel tempo (*Time Correlated Single Photon*); PMT= tubo fotomoltiplicatore (*Photon Multiplier Tube*).

La disponibilità di tecniche non-invasive ad alta sensibilità per la diagnosi e il monitoraggio della risposta alla terapia dell'artrite reumatoide risulterebbe di fondamentale importanza nella scelta della terapia, delle dosi appropriate di farmaci, e nello sviluppo di farmaci più efficaci.

In questo ambito, l'utilizzo dell'*imaging* ottico costituisce un approccio sperimentale che permette di seguire l'evoluzione di processi biologici, fisiologici e patologici, all'interno di tessuti ed organi nell'animale in vivo.

Scopo del nostro studio è la valutazione della possibilità di impiego di nuovi "*probe* fluorescenti" (sonde+ligandi) per *imaging* ottico nella diagnosi precoce e nel *follow-up* terapeutico del trattamento con farmaci dell'artrite reumatoide.

A tal fine risulta indispensabile poter disporre di modelli *in vivo* di artrite tali da poter garantire le condizioni più ideali, in termini di analogia con lo sviluppo della patologia in ambito umano, per lo studio delle diverse fasi evolutive e dei diversi gradi di severità della flogosi artrosinovitica. Non essendo a tutt'oggi nota una chiara condizione di sviluppo spontaneo di artrite in alcun ceppo di piccoli animali, sono state messe a punto nel tempo diverse condizioni di artrite indotta, in particolare in piccoli roditori, che hanno assicurato,

con modalità ben riproducibili, lo sviluppo di eventi infiammatori, mono o pluriarticolari, aventi caratteristiche cliniche e di modificazioni istomorfologiche locali, molto simili a quelle riscontrabili nella patologia umana. I modelli di artrite reumatoide indotti nel ratto e nel topo sono ampiamente descritti in letteratura e sono correntemente utilizzati negli studi di efficacia dell'azione di farmaci antinfiammatori ed immunomodulanti garantendo, a tutt'oggi, dati informativi che risultano essere predittivi per l'uso in ambito clinico (Bendele, 1999).

4.1.3 Modelli Sperimentali Animali di Artrosinovite

Per una maggiore comprensione dei meccanismi fisiopatologici sottesi allo sviluppo e alla progressione delle malattie infiammatorie articolari sono stati sviluppati modelli sperimentali a livello animale.

Tali modelli hanno permesso di ottenere informazioni fondamentali su molti degli aspetti genetici, immunologici e istopatologici dell'artrite reumatoide e di altre condizioni infiammatorie del distretto articolare (Kannan, 2005; Seki, 1988).

I dati ottenuti dalle valutazioni sperimentali animali necessitano di essere solitamente valutati con una certa cautela poiché non è ovviamente sempre possibile trasferire dati dell'animale all'uomo. Ad esempio non è comune, a differenza di quanto riscontrabile epidemiologicamente in ambito umano, lo sviluppo autonomo, spontaneo, di artrite nell'animale e va segnalato, infatti, che solo in tempi recenti è stato sviluppato un nuovo modello murino (K/BxN) di spontaneo sviluppo di una forma di artrite molto aggressiva, che si manifesta entro la quarta settimana di età (Monach, 2007). Come per l'artrite reumatoide, questa forma appare cronica, progressiva, a carattere simmetrico, e caratterizzata da aspetti istologici simili alla sinovite reumatoide, con formazione del panno e danno tissutale cartilagineo ed osseo correlato alle citochine infiammatorie quali IL1 e TNF- α . In questa forma sono presenti inoltre anomalie immunologiche quali un'attivazione policlonale delle cellule B, ipergammaglobulinemia e produzione di autoanticorpi, fatta eccezione per i Fattori Reumatoidi.

A ulteriore riprova della non assoluta comparabilità del fenomeno artritico animale con la forma artritica reumatoide umana vi è il non chiaro coinvolgimento sistemico ed il tipo di modificazioni dei parametri ematochimici ed autoimmuni. Storicamente, però, gli studi sugli animali si sono rivelati molto utili nella valutazione del danno istologico locale, del tipo di cellule immunologiche coinvolte e del tipo di mediatori molecolari locali della flogosi e della

risposta immune, del tutto analoghi, nell'animale, a quelli delle forme umane. Ruolo fondamentale, inoltre, hanno avuto gli studi sui modelli animali nel descrivere l'efficacia di nuovi approcci terapeutici ed essi hanno aperto la strada all'impiego di terapie oggi correntemente in uso in ambito clinico. Infine, i diversi modelli animali di patologia artritica, hanno permesso di poter analizzare le fasi distinte della patologia artritica, sia nella sua forma acuta, sia in corso di condizione cronica evolutiva. E' stato infatti possibile studiare e caratterizzare, in tempi più circoscritti rispetto all'uomo, ma in analogia agli sviluppi della patologia umana, le diverse fasi di progressione della malattia, gli sviluppi della neoangiogenesi e della fibrosi e i caratteri istologici correlati con il maggior grado di evolutività verso la forma ultima destrutturante erosiva ed osteopenizzante, distrettuale e sistemica.

Artrite antigene-indotta

Questo modello sperimentale prevede l'instillazione in cavità articolare di un antigene esogeno quale l'Albumina Bovina Sierica metilata (mBSA) dopo che vi sia stata una precedente sensibilizzazione dell'animale (ratto, topo, coniglio) con almeno due iniezioni intra-dermiche dello stesso antigene (Cooke, 1975; Hadler, 1976; Andersson, 1988).

Clinicamente la flogosi è evidente già nel corso della seconda giornata, raggiunge la massima espressione dopo 6-7 giorni e conduce ad una forma degenerativa irreversibile a distanza di 2-3 settimane.

Artrite indotta dalla soppressione della proteina CD 59

Nel 1997 Mizuno *e coll.* proposero un modello sperimentale di artrite reumatoide condotto su ratti che prevedeva la somministrazione di un anticorpo monoclonale (Mab 6D1) in grado di riconoscere una proteina di membrana denominata CD 59 presente sulla superficie delle cellule della sinovia, nel tessuto connettivo sub-sinoviale e nei capillari.

La somministrazione dell'anticorpo Mab 6D1, nella cavità articolare, provocava la comparsa di un'acuta e fugace artropatia infiammatoria caratterizzata dall'adesione del MAC sulla superficie sinoviale.

Artrite da iniezione di pristano (2,6,10,14-Tetrametilpentadecano).

E' possibile ottenere nel ratto, dopo singola somministrazione di una piccola dose di pristano una forma cronica di artrite che ha un carattere di attività moderata, ma con recidivanti riacutizzazioni (Olofsson, Holmdahl, 2007). L'esordio dell'artrite è in forma acuta, con edema

che compare già dopo 2 settimane dall'iniezione, con presenza di infiltrato cellulare polimorfonucleato e mononucleare. Successivamente, nella fase cronica, compare il panno sinoviale, le lesioni erosive della cartilagine e dell'osso. L'artrite da pristano è strettamente dipendente dalla risposta immunitaria mediata dai linfociti T CD4+, e può essere indotta anche con trasferimento passivo di queste cellule attivate.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Ancoraggio di Molecole Sonda a Strutture Saccaridiche di Riconoscimento Molecolare.

Lys-DTPA terbutilato e Lys-AAZTA terbutilato sono stati donati dai laboratori Bracco Imaging SpA.

D(+)-lattosio monoidrato, gadolinio cloruro, sodio cianoboroidruro, acetonitrile e metanolo sono stati acquistati da Sigma-Aldrich; acido acetico glaciale, acido trifluoroacetico e toluene sono stati forniti da Merk.

La purificazione è stata condotta sia con cromatografia ad esclusione dimensionale (resina Superdex, l= 92, ø= 2 cm) sia con tecnica HPLC. In questo caso si è usato un sistema HPLC-UV Merk-Hitachi equipaggiato con una pompa L-6200, un autocampionatore AS-2000A e un sistema a Diode Array Detector L-4500A. L'acquisizione e l'analisi dei dati sono state condotte con un D-7000 Chromatography Data Station software (Merck- Hitachi), utilizzando colonne semipreparative Luna NH₂ 100 A (Phoemenex), 10 x 250 mm e Spherisorb phenyl semiprep (Waters), 10 x 250 mm.

Le analisi di spettrometria di massa electrospray sono state condotte con uno spettrometro di massa a trappola ionica (modello LCQ Deca XP Plus, Thermo-Finnigan. San Jose, CA, USA), nella modalità di ionizzazione positiva (+4.5 kV).

Le misure di risonanza magnetica nucleare sono state condotte con uno strumento JEOL ECX (400 MHz).

Lattit-1-il-Lys-DTPAtBut

0.5 mmol di lattosio sono state sciolte in 0.5 mL di acqua bidistillata e aggiunte ad una miscela costituita da 1.34 mmol di Lys-DTPA terbutilato disciolto in metanolo (6.266 mL),

0.733 mL di acido acetico glaciale e 70 mg di sodio cianoboroidruro. La soluzione risultante è stata incubata per 5 ore a 55 °C.

La purificazione del grezzo di reazione è stata ottenuta tramite HPLC utilizzando una colonna cromatografica a fase normale (fase amminica). Il prodotto è stato eluito isocraticamente con acetonitrile/acqua (90/10). Il sistema è stato collegato ad un raccoglitore di frazioni automatico e le frazioni pure sono state riunite e seccate per evaporazione sotto vuoto spinto (0.272 g, 50.8%).

Deprotezione di Lattit-1-*il*-Lys-DTPAtBut

0.254 mmol di lattit-1-*il*-Lys-DTPA terbutilato sono stati risospesi in 0.836 mL di diclorometano. 4.7 mL acido trifluoroacetico (TFA) sono stati aggiunti alla sospensione a 0°C, e la soluzione è stata mantenuta sotto agitazione a temperature ambiente per 48 ore. Il solvente è stato quindi rimosso per evaporazione sotto vuoto spinto ed il TFA è stato allontanato per successivi cicli di co-evaporazione con toluene (5 x 5 mL). E' stato quindi ottenuto un olio giallo che è stato ridisciolti in acqua deionizzata e purificato su colonna ad esclusione dimensionale. Le frazioni pure sono state raccolte e concentrate dando il composto finale in forma completamente deprotetta (51.3 mg, 25.6%).

Lys-DTPA

1.34 mmol di Lys-DTPA terbutilato sono stati sciolti in 10 mL di TFA a 0 °C, quindi la soluzione è stata mantenuta sotto agitazione a temperature ambiente per 48 ore. L'acido trifluoroacetico è stato eliminato per co-evaporazione con toluene (5 x 10 mL) e portato a secco per mezzo di evaporazione sotto vuoto spinto. Il prodotto ottenuto è stato risospeso in acqua bidistillata e purificato su colonna ad esclusione dimensionale. Le frazioni pure sono state riunite e concentrate (343.36 mg, 55.22%).

Sintesi di Lattit-1-*il*-Lys-DTPA dal legante deprotetto

0.274 mmol di lattosio sono state disciolte in 1 mL di acqua bidistillata e aggiunte ad una miscela costituita da 0.74 mmol di Lys-DTPA completamente deprotetto disciolto in metanolo (3 mL), 0.350 mL di acido acetico glaciale e 70 mg di sodio cianoboroidruro. La soluzione risultante è stata mantenuta in una *vial* chiusa con tappo a vite a 55 °C over-night. La miscela di reazione è stata portata a secco per mezzo di evaporazione sotto vuoto spinto e ridisciolta in 5 mL di acqua bidistillata. La soluzione risultante è stata purificata su colonna ad esclusione dimensionale. Le frazioni pure sono state riunite e concentrate (47 mg, 22%).

Complesso Lattit-1-*il*-Lys-DTPA-Gd e Lattit-1-*il*-Lys-DTPA-La

Una soluzione acquosa di gadolinio cloruro (rapporto molare ligando/gadolinio pari a 1/1) oppure di lantanio cloruro è stata lentamente aggiunta a lattit-1-*il*-Lys-DTPA mantenendo il pH tra 6 e 7, per aggiunta di una soluzione 0.1 N di NH₄OH. Dopo due ore la soluzione è stata concentrata e purificata su colonna ad esclusione dimensionale. Le frazioni pure eluite con acqua sono state sottoposte a test con xilenolo per la determinazione del gadolinio libero. Le frazioni risultate negative al test sono state unite e liofilizzate (resa, 61%).

Lys-AAZTA

0.3 mmol di Lys-AAZTA terbutilato sono state sciolte in 1.54 mL di TFA a 0°C e mantenute sotto agitazione a temperatura ambiente per 48 ore.

L'acido trifluoroacetico in eccesso è stato eliminato per co-evaporazione con toluene e l'olio ottenuto è stato risolubilizzato con acqua bidistillata. Il prodotto è stato purificato con colonna ad esclusione dimensionale. Le frazioni pure sono state riunite e concentrate (resa, 61%).

Sintesi di Lattit-1-*il*-Lys-AAZTA

0.063 mmol di lattosio sono stati sciolti in 0.189 mL di acqua bidistillata e aggiunti ad una miscela costituita da 0.15 mmol di Lys-AAZTA completamente deprotetto disciolto in metanolo (1.67 mL), 0.066 mL di acido acetico glaciale e 70 mg di sodio cianoboroidruro. La soluzione risultante è stata incubata a 55 °C *overnight*.

La miscela di reazione è stata portata a secco per mezzo di evaporazione sotto vuoto spinto e ridisciolta in 5 mL di acqua bidistillata. La soluzione risultante è stata purificata su colonna ad esclusione dimensionale. Le frazioni pure sono state riunite e concentrate (34.73 mg, 73%).

Complesso di Lattit-1-*il*-Lys-AAZTA-Gd

Ad una soluzione acquosa di gadolinio cloruro (rapporto molare ligando/gadolinio pari a 1/1) è stato aggiunto lentamente lattit-1-*il*-Lys-AAZTA mantenendo il pH tra 6 e 7, per aggiunta di una soluzione 0.1 N di NH₄OH. Dopo due ore la soluzione è stata concentrata e caricata su una colonna ad esclusione dimensionale. Le frazioni pure eluite con acqua sono state sottoposte ad un test tramite xilenolo per la determinazione del gadolinio libero. Le frazioni risultanti negative al test sono state riunite e liofilizzate (resa, 60%).

Ancoraggio di molecole sonda per optical imaging ai polimeri selezionati:

Materiali

La Cianina 5.5 monofunzionale è stata fornita da GE Healthcare.

Il destrano coniugato con la cianina 5.5 (PM 70'000) è stato acquistato da NANOCS.

Metodi

Il Chitlac e il chitosano sono stati coniugati alla cianina seguendo le indicazioni del fornitore della sonda. In breve, 1 mg di Chitlac o di chitosano sono stati sciolti in 1 mL di tampone bicarbonato di sodio 0.1 M a pH 9.2. Questa soluzione è stata aggiunta ad una fiala di Cy5.5 e lasciata agitare per 4 ore. La soluzione è stata quindi dializzata contro acqua bidistillata e successivamente liofilizzata.

Per l'iniezione endovenosa è stato utilizzato un Chitlac a basso peso molecolare derivatizzato con Cy5.5 come sopra descritto.

4.2.2 *Animali ed Esperimenti in Vivo*

4.2.2.1 MRI

Per le analisi all'MRI è stato utilizzato uno strumento a 7 Tesla con spettrometro Pharmascan -Bruker dedicato allo studio di piccoli animali.

Due topi CD1 (femmine) di circa 17 settimane di età e circa 40 g di peso sono stati trattati con Magnevist® e dopo 24 ore con Lattit-1-il-Lys-DTPA-Gd, entrambi per iniezione endovenosa di 100 µmol/kg. Ciascuna iniezione è stata preceduta da un'immagine pre-iniezione.

Sono state eseguite sequenze FLASH (*Fast Low Angle Shot*) T₁W con T_R pari a 74.9 ms e T_E pari a 2.0 ms, angolo di rotazione di 60° e risoluzione in piano pari a 0.200 x 0.200 mm² e sequenze MSME (*Multislice Multiecho Sequence*) T₁W con T_R pari a 162.9 ms e T_E pari a 8.4 ms, risoluzione in piano pari a 0.200 x 0.200 mm².

4.2.2.2 Test di immunogenicità

I biopolimeri utilizzati sono stati: acido ialuronico, amilosio, Chitlac, destrano (40 e 70 KDa), HSMA (*Hydrolyzed Styrene-Maleic Anhydride*), nella loro forma non coniugata per l'inoculo dei topi e nella forma biotinilata per eseguire i test ELISA.

Per valutare la risposta immunogenica dei vari polimeri su diversi background genetici sono stati usati topi appartenenti a tre ceppi diversi: BALB/c, C57Bl/6 e DBA acquistati dalla ditta Harlan (Milano, Italia).

Due topi per ceppo sono stati inoculati intraperitonealmente con 100 µg di ogni biopolimero diluito in PBS. L'immunizzazione è stata ripetuta per tre volte ad intervalli di 7 giorni. Allo

scadere dei 28 giorni il siero dei topi è stato testato in ELISA per verificare il titolo anticorpale di IgG e IgM sviluppato. A questo scopo i pozzetti di una piastra da 96 pozzetti sono stati incubati prima con streptavidina (10 µg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluita in tampone carbonato 0,1 M, pH 9,6, a 4°C per 18h, quindi dopo 2 lavaggi con PBS, sono stati incubati per 2h a 37°C con i diversi polimeri biotinilati ad una concentrazione di 100 µg/mL in PBS. Dopo opportuni lavaggi e il blocco dei siti aspecifici (PBS, Bovine Serum Albumin (BSA) 1% per 1h a temperatura ambiente), il siero degli animali è stato aggiunto ai vari pozzetti in quantità scalari ed incubato per 1h a temperatura ambiente. Il legame degli anticorpi specifici ai biopolimeri adsorbiti sul fondo della piastra è stato rivelato con gli anticorpi secondari anti IgG e anti IgM di topo, coniugati con perossidasi (1:1000; Amersham Bioscience). Infine, la reazione colorimetrica sviluppata dopo l'aggiunta del substrato per la perossidasi ABTS (Sigma; diluito in tampone citrato 0,1 M ad una concentrazione di 1 mg/mL; Sigma) è stata letta con lo spettrofotometro (GENios Plus, TECAN Italia srl, Mi, Italia) a 405nm.

4.2.2.3 Imaging Ottico

Ratti Wistar sono stati immunizzati con somministrazioni intradermiche, sul dorso, in prossimità della coda, contenenti 100 µg di mBSA (Albumina bovina serica metilata; Sigma Chem, St. Louis, USA) diluiti in 200 µL di soluzione fisiologica sterile e 200 µL di ACF (Antigene Completo di Freund, con 250 µg di *Mycobacterium Tuberculosis*; Sigma Chem, St. Louis, MO, USA) effettuate in duplice fase, a distanza di 7 giorni una dall'altra (=giorni -21 e -14).

Dopo 14 giorni dalla seconda iniezione intradermica (=giorno 0) viene indotta l'artrite mediante iniezione intra-articolare (a livello di ciascun ginocchio) per ciascun animale di una soluzione contenente 100 µg di mBSA diluita in 100 µL di soluzione fisiologica sterile.

Nelle giornate successive a quella dell'iniezione intra-articolare, il controllo clinico della tumefazione articolare viene effettuato mediante metodica pletismografica (mod.520, Ugo Basile, Varese) e misurando i diametri antero-posteriore e latero-mediale delle articolazioni femoro-tibiali utilizzando un apposito calibro.

A 4 giorni dall'induzione dell'artrite è stata effettuata un'analisi all'imaging ottico prima e dopo l'iniezione intrarticolare di 100 µL di sonda. Gli animali sono stati monitorati all'*imaging* ottico a 0h, 24h, 48h, 72h, 144h e 168h per gli esperimenti condotti con

Chitlac/destrano; 5h, 24h, 96h, 120h, 144h e 168h per gli esperimenti condotti con Chitlac/chitosano, questi ultimi esperimenti sono stati condotti in duplicato.

Come controlli sono stati utilizzati animali a cui non è stata indotta la patologia e che hanno subito le stesse iniezioni intrarticolari di sonde.

Un animale è stato trattato per somministrazione endovenosa di 500 μ L di Chitlac a basso peso molecolare.

In occasione di ogni trattamento, gli animali sono stati preventivamente anestetizzati impiegando l'Avertina (Tribromo-etanolo; Sigma Chem, St. Louis USA). Per la preparazione, il farmaco in polvere viene diluito in alcool etilico in un rapporto 50% e conservato successivamente a -20°C al riparo dalla luce.

Al momento dell'uso, la soluzione viene ulteriormente diluita con soluzione fisiologica in un rapporto 1:20 (v/v). Di questa soluzione, si somministra per via intra-peritoneale una quantità di 1-1,5 mL per ogni 100 grammi di peso corporeo dell'animale e ciò consente di ottenere un'adeguata anestesia per almeno 20/30 minuti.

4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.3.1 Ancoraggio di molecole sonda a strutture saccaridiche di riconoscimento molecolare

a. Coniugati di Lys-DTPA

Nel corso del progetto di Dottorato sono state messe a punto strategie sintetiche per legare chelanti di metalli paramagnetici, come il gadolinio, a delle unità saccaridiche che conservassero le loro attività biologiche sì da poter funzionare da agenti *targeting*. Un costrutto di questo tipo dovrebbe consentire una significativa riduzione della dose somministrata, dovuta all'attesa alta specificità del mezzo di contrasto.

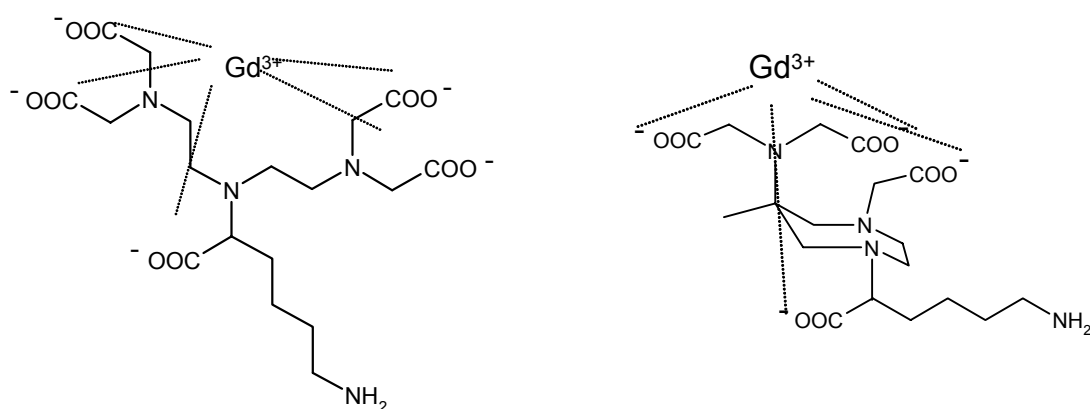
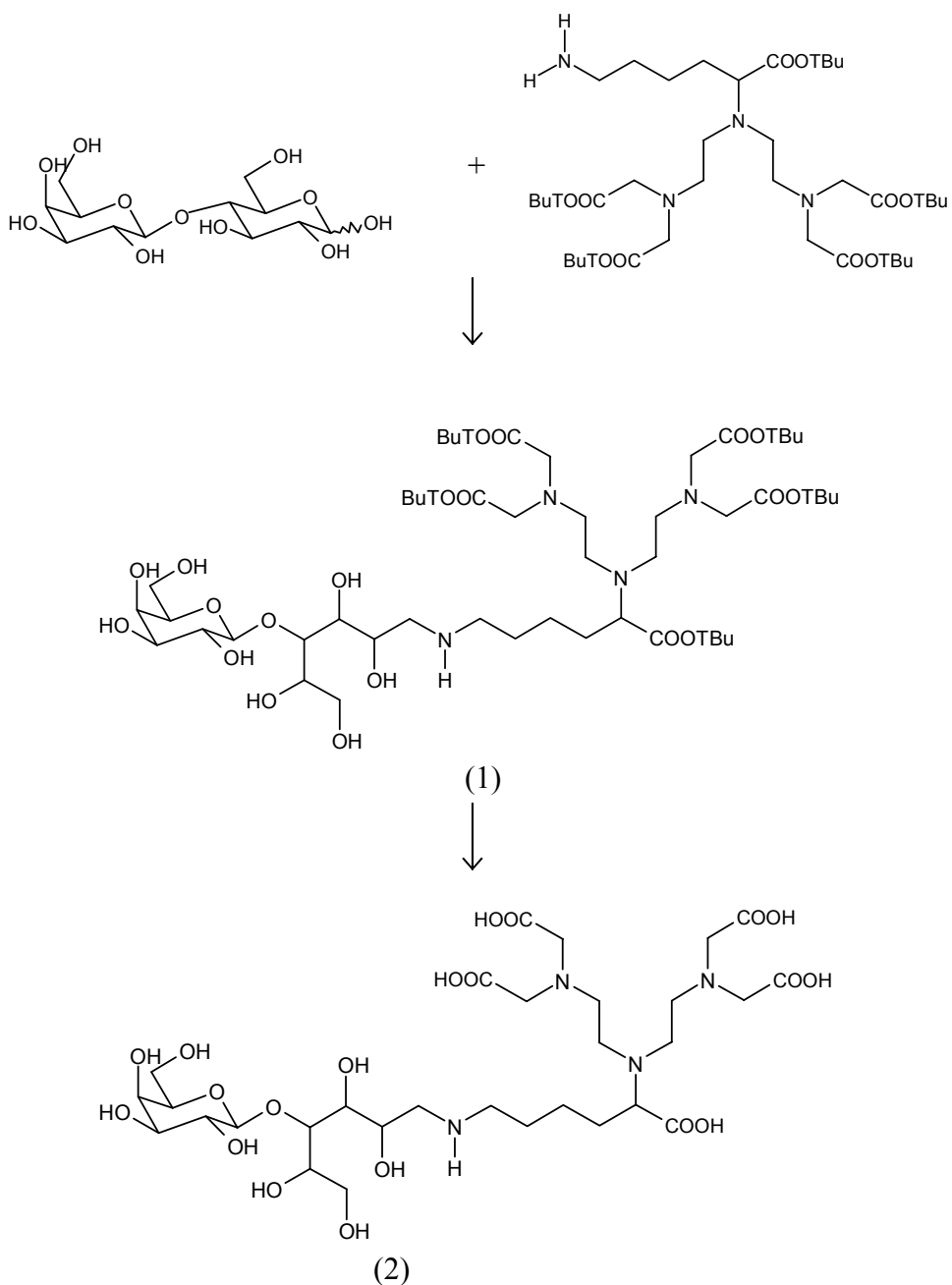


Figura 4.3. Rappresentazione delle strutture di due complessi di gadolinio: a sinistra il Lys-DTPAGd, a destra il Lys-AAZTAGd

Per permettere ciò si è seguita la strategia dell'amminazione riduttiva di unità saccaridiche contenenti un'estremità galattosidica, come il lattosio. Un primo approccio sintetico ha riguardato il legame di un chelante del gadolinio (Lys-DTPA, N₂,N₂-Bis[2-[bis(carbossimetil)ammino]etil]-L-lisina, riportato in Figura 4.3) del gadolinio in forma protetta (esteri terbutilici). Il Lys-DTPA (Anelli, 1999) è un interessante derivato del DTPA, nel quale la presenza di un gruppo amminico permette l'ulteriore modifica della molecola. In letteratura solo pochi lavori riportano l'uso di questo chelante (Langereis 2004), mentre più spesso vengono usati come mezzi di contrasto omopolimeri di lisina modificata con DTPA (Curtet, 1998).

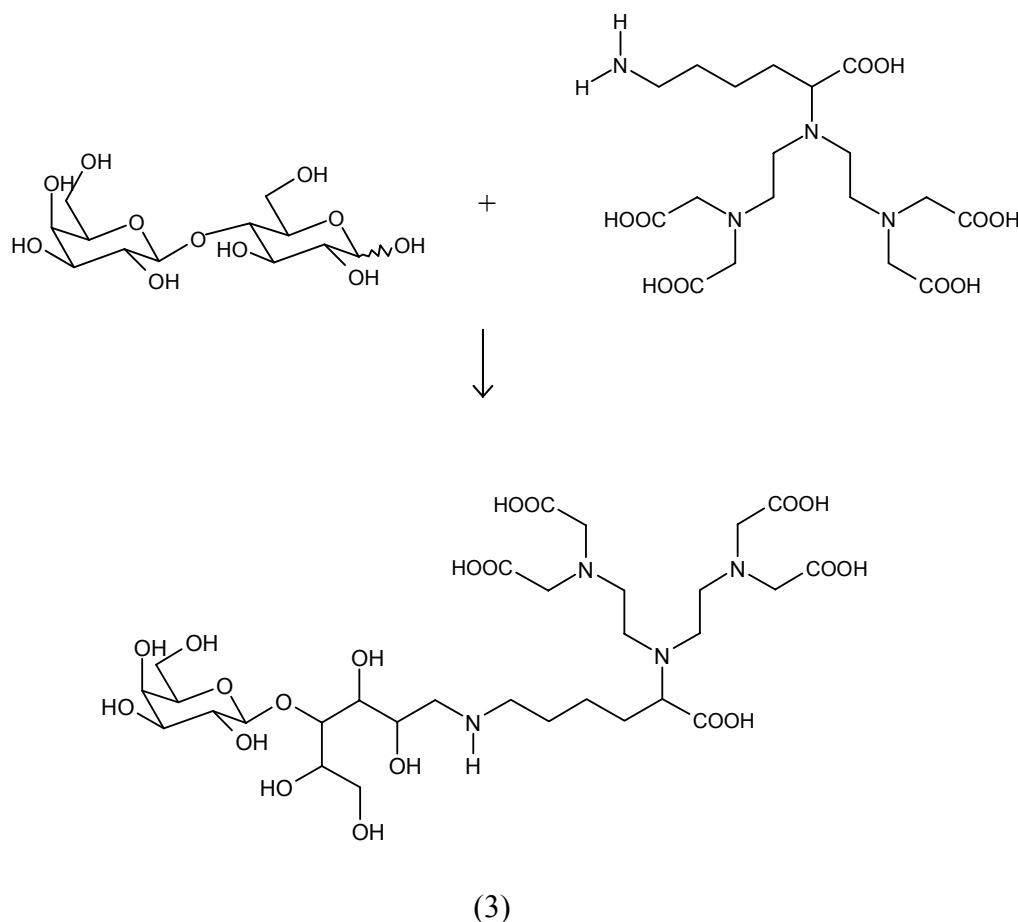
Il prodotto di coniugazione, ottenuto mediante amminazione riduttiva dell'aldeide del lattosio, con un meccanismo del tutto analogo alla sintesi del Chitlac, è stato purificato tramite HPLC, quindi i gruppi carbossilici del nuovo chelante sono stati deprotetti e il prodotto così ottenuto nuovamente purificato. Tale strategia è risultata laboriosa e con una resa finale molto bassa (13%).

Schema 4.1.



Si è deciso quindi di tentare un secondo approccio sintetico, conducendo la reazione di amminazione riduttiva a partire dal chelante iniziale in forma già deprotetta. In questo caso la purificazione del prodotto può essere ottenuta per cromatografia ad esclusione dimensionale e si ottiene un incremento della resa pari al 9%. I due diversi percorsi sintetici intrapresi sono riportati negli schemi 4.1 e 4.2.

Schema 4.2



L'incremento di resa ottenuto partendo dai chelanti deprotetti è da imputarsi alla labilità del legame glicosidico in presenza di acidi forti come quelli richiesti per ottenere la deprotezione dei gruppi carbossilici. Deprotegendo quindi il chelante a monte della reazione di amminazione riduttiva con lo zucchero, si evitano perdite significative del prodotto desiderato.

E' da sottolineare che la sintesi, condotta a partire da chelanti non protetti, è particolarmente innovativa, in quanto tutti i successivi passaggi sintetici sono condotti in acqua o in soluzioni idroalcoliche, che hanno un bassissimo impatto ambientale rispetto ai solventi organici più comunemente in uso per questo tipo di procedure.

Il prodotto ottenuto mediante la seconda strategia è stato ampiamente caratterizzato mediante tecniche di risonanza magnetica nucleare come complesso di lantanio, essendo il gadolinio un metallo paramagnetico e dunque non analizzabile all'NMR.

Al fine di caratterizzare il complesso metallico ottenuto, sono stati confrontati gli spettri ^1H - ^{13}C HSQC che permettono di correlare i segnali protonici con i nuclei di carbonio direttamente legati. L'assegnazione dei segnali è stata eseguita tramite una serie di spettri bidimensionali quali 2D-COSY, 2D-TOCSY-HSQC. In particolare quest'ultimo è alquanto informativo poiché combina l'aumento di risoluzione dello spettro HSQC con l'informazione TOCSY in grado di correlare nuclei legati da costanti di accoppiamento. Il confronto degli spettri HSQC in presenza ed in assenza del metallo permette di seguire il comportamento di ciascun segnale (ogni picco è ben risolto al contrario di quanto accadeva nello spettro ^1H) in seguito alla formazione del complesso.

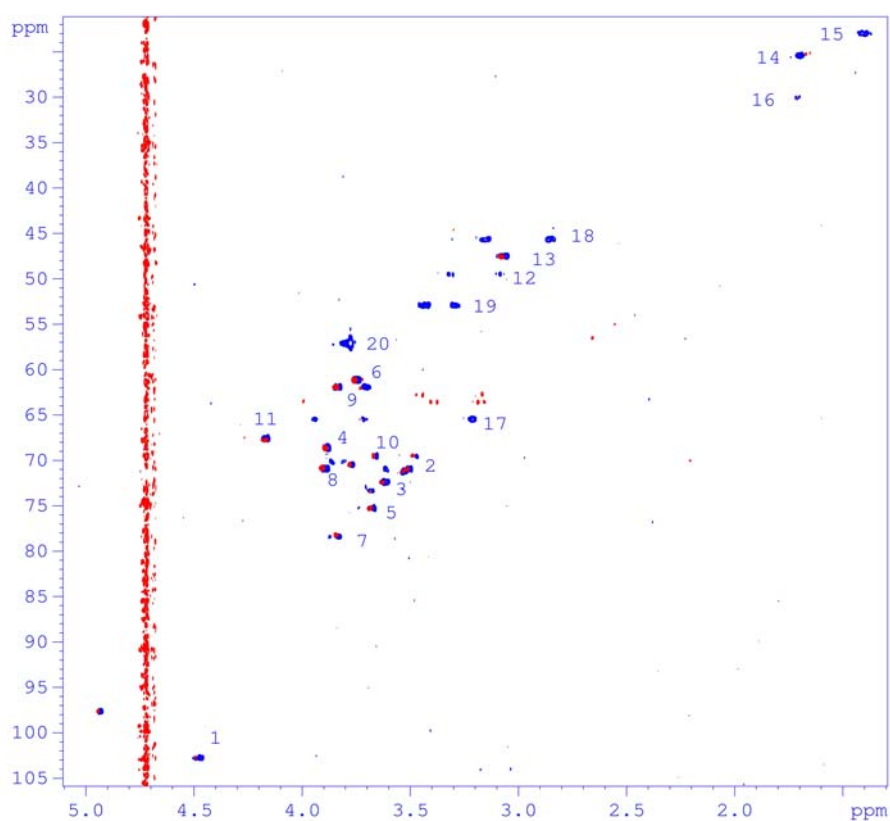


Figura 4.4. Spettro HSQC. In **blu**: spettro del legante in assenza di lantanio; in **rosso**: spettro del complesso con lantanio

La Figura 4.4 mostra chiaramente come tutta la molecola, fino all'idrogeno in posizione 14 rimanga sostanzialmente invariata e come il metallo sia in grado di chelare la regione del DTPA senza apportare modifiche sostanziali alla parte zuccherina necessaria all'interazione biologica.

Misure di rilassività

Il complesso di gadolinio del Lattit-1-il-Lys-DTPA (che di seguito chiameremo, per comodità, Lac-LysDTPA) è stato testato anche per le sue proprietà rilassometriche, ed ha dimostrato di avere una rilassività superiore a quella del DTPA complessato con lo stesso ione e usato come riferimento. Questo risultato è particolarmente significativo in quanto dal punto di vista delle caratteristiche chimico-fisiche è stata sintetizzata una serie di molecole che hanno una grande potenzialità nel campo della diagnostica per immagini.

I dati ottenuti sono riportati nella Tabella 4.2.

Tabella 4.2. Valori di rilassività per il coniugato Lac-LysDTPA complessato con gadolinio e per il composto di riferimento (complesso del DTPA) misurata in NaCl 0.15 M, pH 7.3.

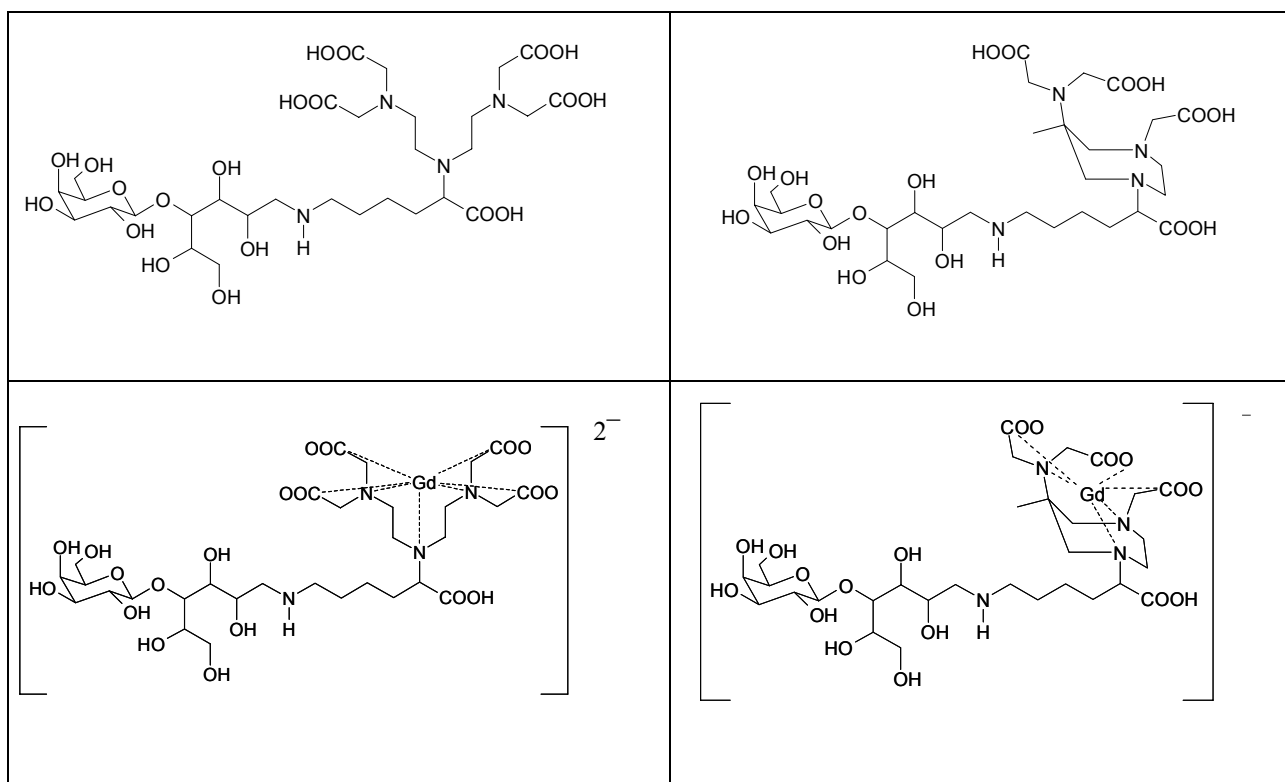
$\text{mmol}^{-1}\text{sec}^{-1}$	r_1	r_2
Lac-LysDTPAGd	5.02	8.93
DTPAGd	3.4	3.8

Coniugati di Lys-AAZTA

Una volta ottimizzate le diverse fasi della sintesi del coniugato del Lys-DTPA, questa è stata riprodotta a partire da un altro chelante del gadolinio, l'AAZTA-lisino, un composto con proprietà rilassometriche maggiori rispetto al derivato del DTPA. Il coniugato è stato ottenuto con una resa analoga al composto precedente.

Lo schema 4.3 riporta la struttura dei due composti ottenuti, come tali e come complessi di gadolinio.

Schema 4.3. Coniugati Lys DTPA e AAZTA DTPA con il lattosio nella loro forma libera e complessata con gadolinio.



4.3.2 *Analisi ed Esperimenti in Vivo*

4.3.2.1 MRI

Topi sani sono stati trattati prima con Magnevist® (DTPAGd, mezzo di contrasto comunemente utilizzato in diagnostica per immagini) e dopo 24 ore con il derivato lattosilato (Lac-LysDTPA) (EP 1964846A1).

Dalle immagini acquisite si vede chiaramente la presenza nei vasi del Lac-LysDTPA, mentre il Magnevist® già dopo 4 minuti non risulta più evidente (Figura 4.5). L'effetto "blood pool" del Lac-LysDTPA è confermato da misure effettuate a tempi più lunghi (Figura 4.5, riquadri inferiori): dopo 45 minuti dall'iniezione di Lac-LysDTPA, i vasi appaiono ancora ben evidenti. Inoltre, la via di escrezione del composto è senza dubbio renale, mentre non appare una localizzazione del mezzo di contrasto a livello epatico.

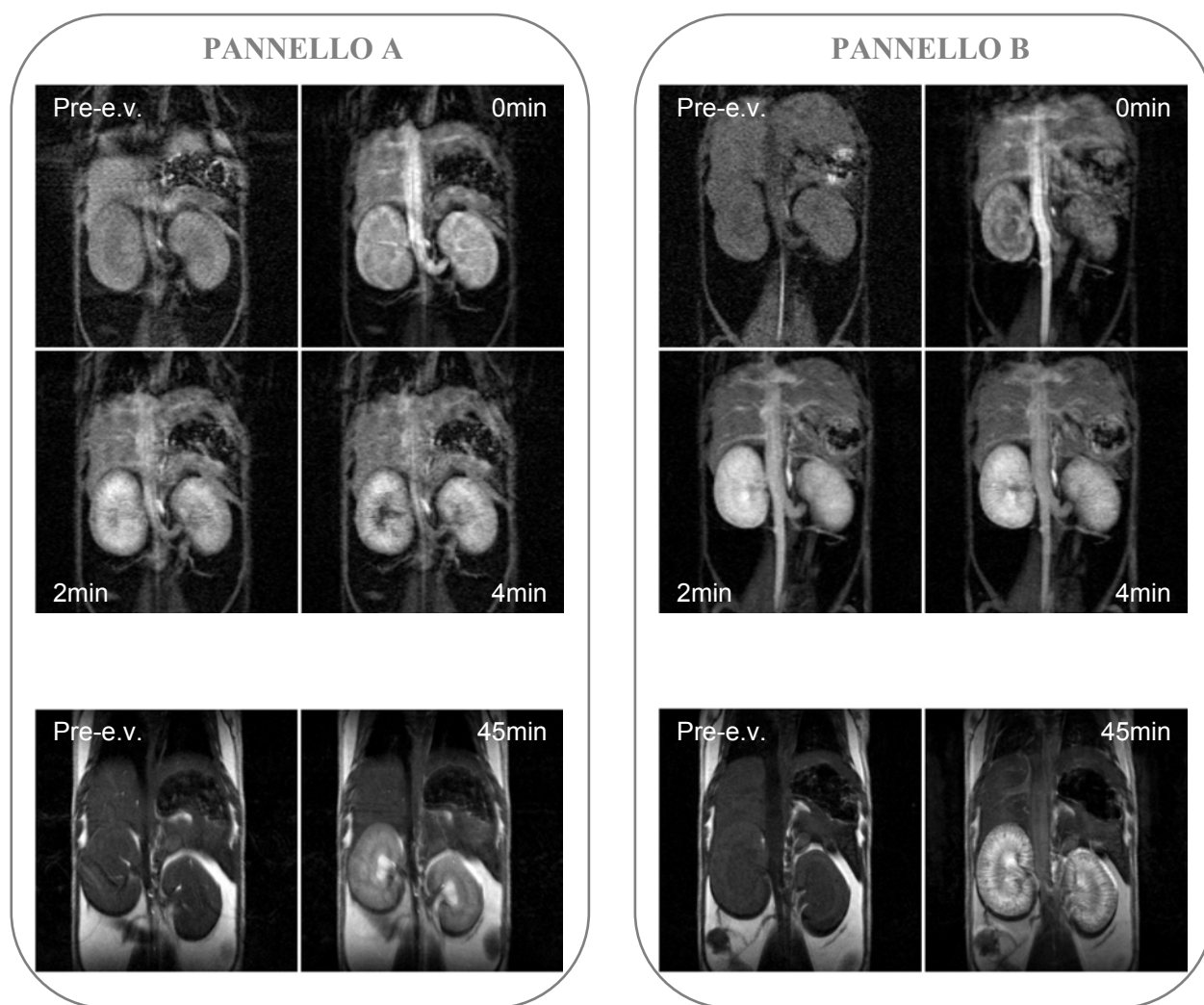


Figura 4.5. Immagini MRI. Pannello A, immagini ottenute per somministrazione e.v. di Magnevist®; pannello B, immagini ottenute per somministrazione e.v. di Lac-LysDTPA. Sopra, immagini ottenute in sequenza FLASH; sotto, immagini ottenute in sequenza MSME.

4.3.2.2 Test di immunogenicità

Per poter al meglio definire il potenziale utilizzo del polisaccaride Chitlac come sonda per l'*imaging* molecole, si è scelto di effettuare degli studi preliminari di immunogenicità (Theilacker, 2003; Kobayashi, 2003; Mehvar, 2000). A questo scopo sono state effettuate delle prove *in vivo* inoculando intraperitonealmente dei topi con il Chitlac e altri composti polimerici di riferimento (acido ialuronico, amilosio, destrano da 40 e 70 KDa, HSMA) e testando il siero dopo almeno tre richiami. Per evitare di valutare una risposta anticorpale determinata dal *background* genetico degli animali sono state esaminate le risposte di tre ceppi diversi di topi: BALB/c, C57Bl/6 e DBA.

Nonostante la variabilità di risposta riscontrata nei diversi *background* genetici è possibile concludere che il destrano ad alto peso molecolare (70 KDa) e l'amilosio hanno fornito le risposte immunologiche più alte (benché comunque basse). Destrano (40 KDa), Chitlac, HSMA e acido ialuronico invece hanno dimostrato risposte inferiori (Figura 4.5).

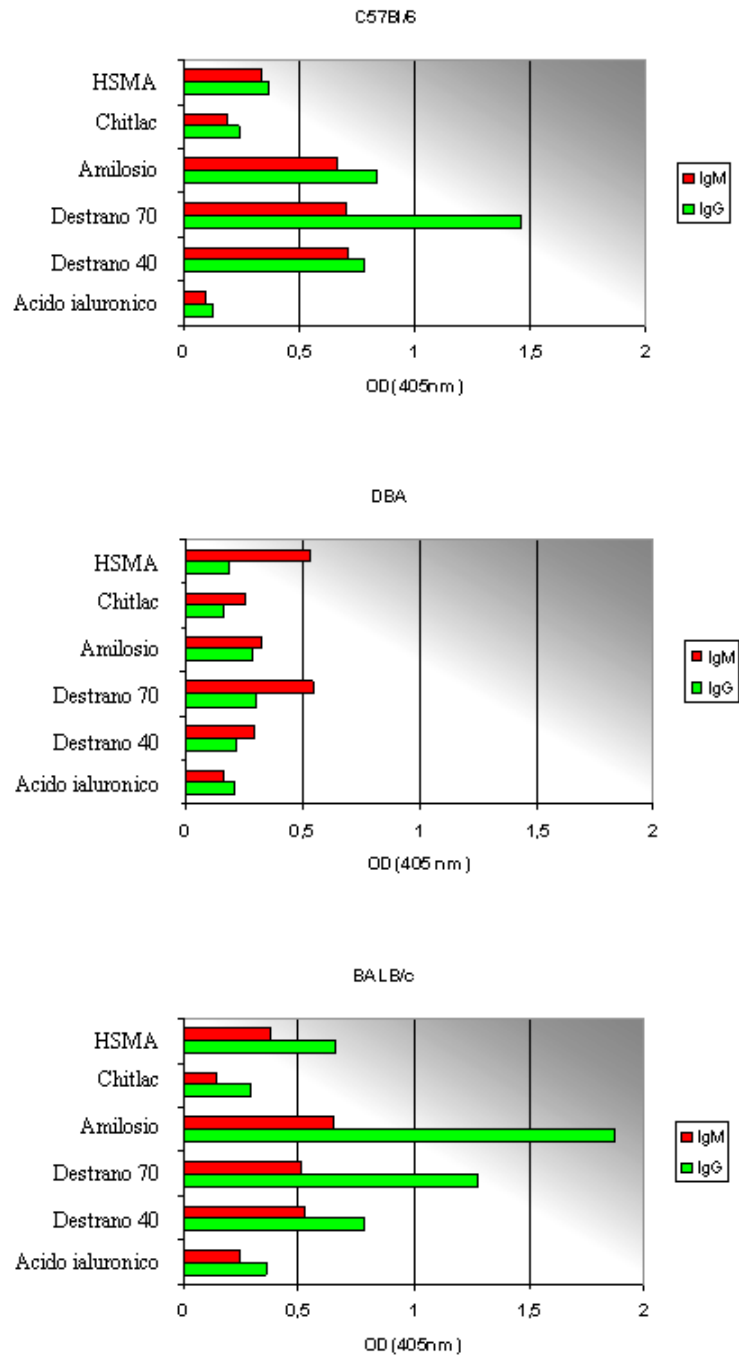


Figura 4.5. Titoli anticorpali riscontrati nel siero dei topi immunizzati valutati dopo tre richiami.

Il Chitlac si è quindi dimostrato un polimero sicuro da poter essere ulteriormente studiato *in vivo* per le sue potenzialità di sonda diagnostica.

4.3.2.3 Imaging Ottico

Alcune prove preliminari sono state effettuate utilizzando l'*imaging* ottico su un modello sperimentale di artrite sinoviale. Il modello sperimentale scelto prevede l'instillazione in cavità articolare di un antigene esogeno quale l'Albumina Bovina Sierica metilata (mBSA) dopo che vi sia stata una precedente sensibilizzazione dell'animale (ratto, topo, coniglio) con almeno due iniezioni intra-dermiche dello stesso antigene (Cooke, 1975; Hadler, 1976; Andersson, 1998).

Clinicamente la flogosi è evidente già nella seconda giornata, raggiunge la massima espressione dopo 6-7 giorni e conduce ad una forma degenerativa irreversibile a distanza di 2-3 settimane.

Esistono ormai definite evidenze, alcune derivanti anche dal gruppo di ricerca di immunopatologia di Trieste, di quelle che sono le diverse modalità di sviluppo, nel tempo, del tipo di infiltrato cellulare infiammatorio, del profilo di citochine e chemochine espresse in tali fasi, e del diverso grado di lesioni anatomico-patologiche presenti nelle diverse fasi di evoluzione della lesione artritica (Andersson, 1998; Woodruff, 2002; Fischetti, 2007).

Il quadro istologico riproduce le lesioni tipiche dell'artrite reumatoide con iperplasia sinoviale, formazione del "panno" ed erosione sia della cartilagine articolare sia dell'osso subcondrale. Dopo circa 1 mese si può osservare una progressiva degenerazione con conseguente anchilosi.

Nello sviluppo del danno articolare in questo modello non si osservano differenze tra i due sessi e sono riconosciuti sia fattori legati all'immunità umorale, ed in particolare l'attivazione del Complemento ad opera del deposito locale di immunocomplessi (Marzari, 2002), sia eventi correlati alla risposta cellulo-mediata.

Per quanto concerne il ruolo dei linfociti T, da uno studio condotto da Lens J.W. nel 1986 emergeva che era possibile interferire nello sviluppo del danno articolare nel topo immunizzato con BSA qualora, contemporaneamente all'induzione dell'artrite, fosse somministrato un siero contenente anticorpi anti-linfociti T di topo.

Alcuni lavori hanno confermato il coinvolgimento dei linfociti T nella patogenesi del danno articolare in questo modello osservando che il danno può essere trasferito in altri animali non

trattati dopo la somministrazione di cellule T purificate o cellule T clonali (Brackettz, 1977; Klasen, 1986).

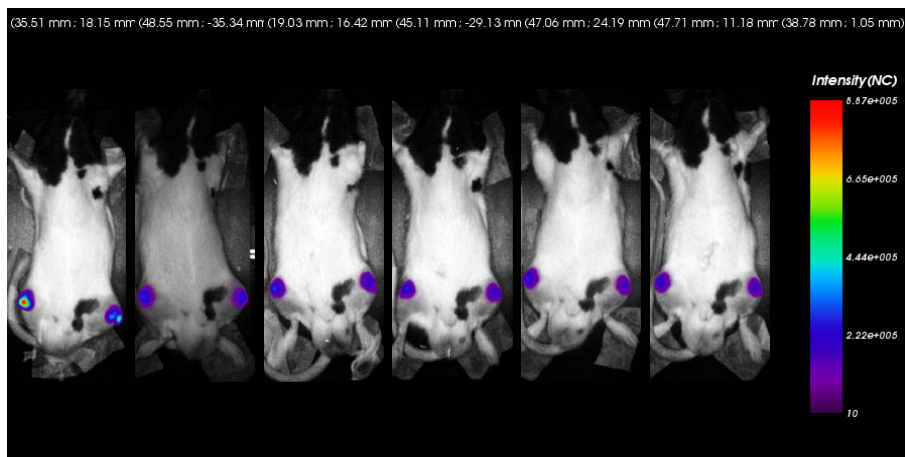
Analogamente a quanto accade nell'uomo, in questo modello è possibile provocare episodi di esacerbazione della flogosi in seguito alla somministrazione orale o intravenosa di BSA metilata nel decorso cronico dell'artrite (Lens, 1986). Ciò sarebbe stato spiegato alla luce degli esami autoradiografici, che avrebbero individuato un selettivo concentrarsi della BSA marcata proprio nelle cavità articolari (non solo quindi quella soggetta ad iniezione intra-articolare con l'antigene) dopo appunto somministrazione orale o intravenosa di BSA metilata (Lens, 1986).

Studi condotti da Andersson e coll. (1998) con metodica scintigrafica hanno dimostrato che la risposta infiammatoria vascolare precede la formazione del panno in questo modello di artrite e che entrambi gli aspetti sono attenuati dalla somministrazione di farmaci anti-infiammatori suggerendo che la formazione del panno sia dipendente dalla reazione vascolare. E' stato inoltre osservato, dagli stessi autori, che l'iperplasia sinoviale è caratterizzata da un'intensa proliferazione cellulare nei primi giorni della flogosi con elevato consumo di glucosio verosimilmente imputabile alla intensa iperplasia e al metabolismo anaerobio provocato dalla temporanea riduzione del flusso ematico.

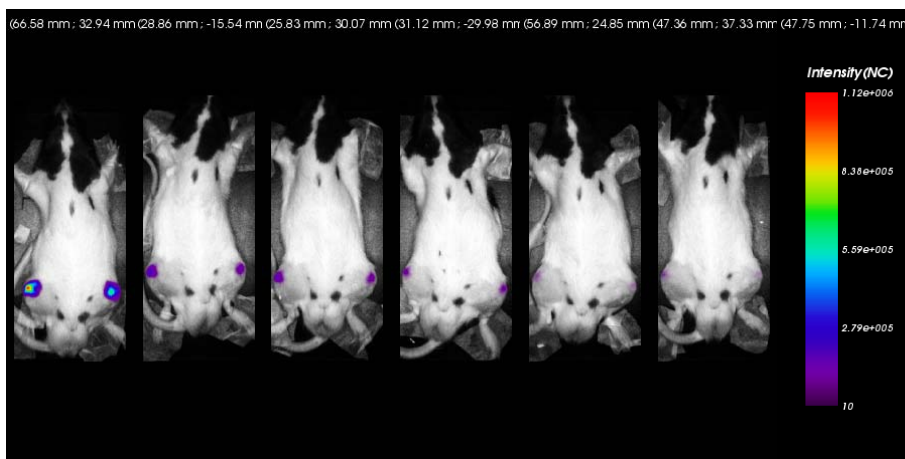
L'induzione della forma artritica in questo modello usualmente comporta una fase specifica di immunizzazione ad un antigene esogeno ed una successiva iniezione di tale antigene in ambito intra-articolare.

In Figura 4.6 sono riportate le immagini ottenute.

A



B



C

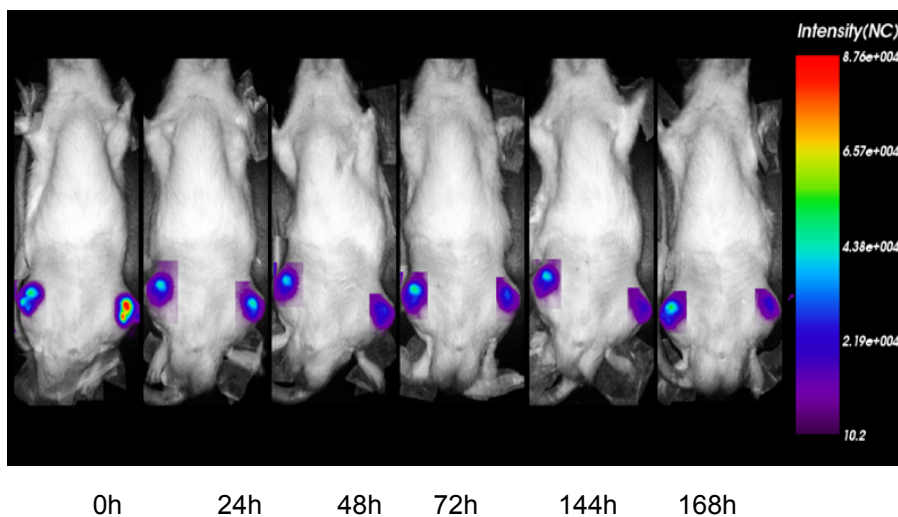


Figura 4.6. *Imaging ottico.* Pannello A, animale sano trattato con destanoCy5.5 in entrambe le ginocchia; pannello B, animale sano trattato con ChitlacCy5.5 in entrambe le ginocchia; pannello C, animale patologico trattato con ChitlacCy5.5, ginocchio sinistro, e destanoCy5.5, ginocchio destro.

Da una prima osservazione risulta che il destrano permane nell'articolazione sia dell'animale sano che del malato più a lungo rispetto al Chitlac. Tuttavia, è da notare come non vi sia una notevole differenza nella permanenza del destrano nell'animale patologico rispetto al sano, diversamente da quanto accade per il Chitlac. Se infatti nell'animale sano già dopo 48 ore il ChitlacCy5.5 residuo risulta notevolmente calato, nell'animale patologico, il Chitlac risulta permanere più a lungo. Le risposte sono state analizzate al fine di ottenere un'indicazione in merito all'intensità relativa della fluorescenza nell'animale artritico rispetto all'animale sano (Figura 4.7).

L'analisi dimostra come vi sia un notevole incremento della permanenza di sonda legata al Chitlac nell'articolazione patologica rispetto a quella sana; incremento non significativo per quanto riguarda la sonda ancorata al destrano. E' evidente, infatti, come il destrano risulti permanere in articolazione in modo analogo in entrambe le tipologie di animale, a differenza del Chitlac che risulterebbe essere dunque una promettente sonda specifico per la patologia.

La stessa osservazione è evidenziabile anche nell'esperimento condotto con Chitlac e chitosano in parallelo.

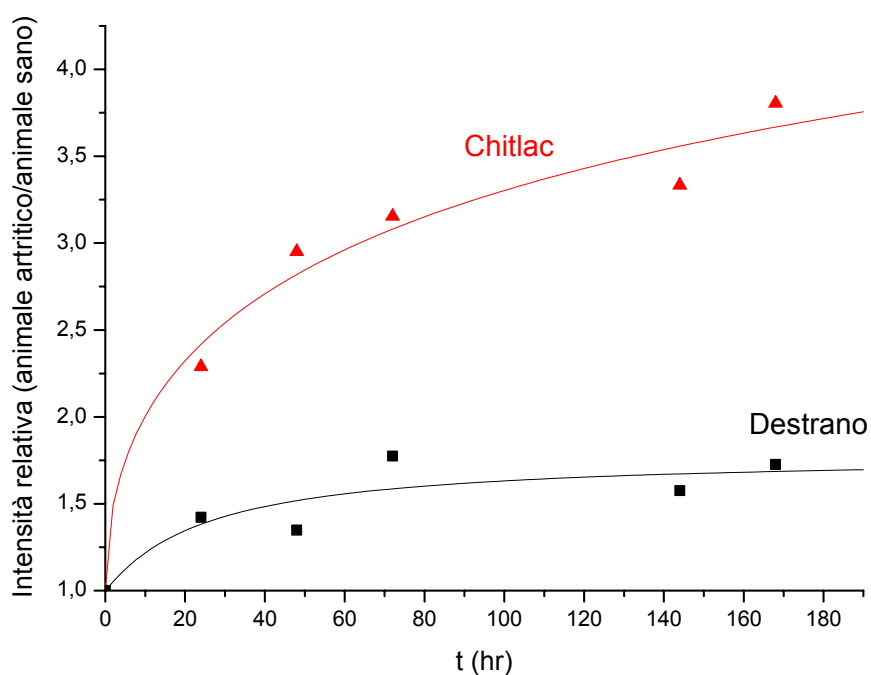


Figura 4.7. Rappresentazione dell'andamento differenziale della fluorescenza. Il grafico riporta la variazione dell'intensità relativa della fluorescenza nell'animale artritico rispetto all'animale sano nel tempo.

Un ulteriore esperimento condotto tramite iniezione endovenosa del Chitlac sintetizzato a partire da chitosano a più basso peso molecolare, ha evidenziato come la sonda ad esso legata sia rilevabile in articolazione già dopo 5 ore dalla somministrazione e permane in misura significativa anche dopo 168 ore (Figura 4.8).

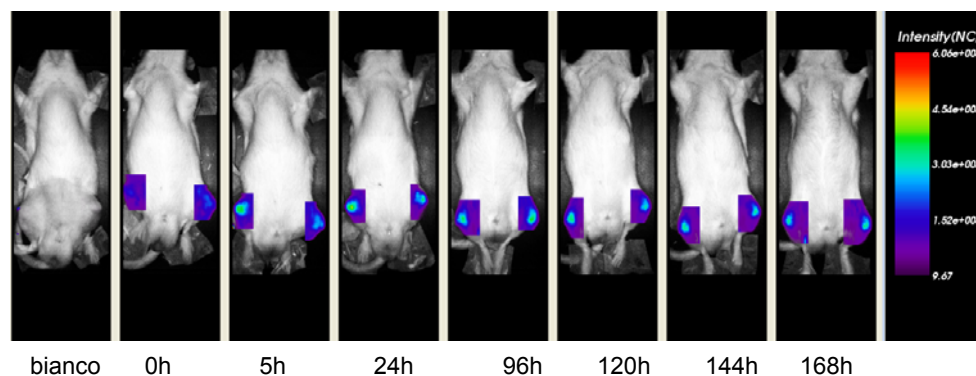


Figura 4.8 Imaging ottico dopo trattamento e.v. di ChitlacCy5.5

4.4. CONCLUSIONI

Nel corso di questa parte dell'attività di ricerca sono state sviluppate strategie sintetiche per l'ancoraggio di sonde per MRI ad unità galattosidiche. In particolare il DTPA e l'AAZTA, entrambi modificati con una catena laterale di lisina, sono stati legati tramite amminazione riduttiva ad un'unità di lattosio. I prodotti sono stati purificati e caratterizzati tramite la tecnica dell'NMR.

L'aggiunta dell'unità saccaridica ha apportato un incremento della rilassività dei relativi complessi di gadolinio, caratteristica rilevante ai fini dello sviluppo di sonde a potenziale diagnostico per MRI.

Dai primi esperimenti condotti *in vivo* si è potuto evidenziare un incremento del contrasto in confronto alla sonda commerciale. Inoltre, la nuova sonda da noi sintetizzata e brevettata (EP 1 964 846 A1) si è dimostrata essere un ottimo *blood pool agent*, ossia un mezzo di contrasto in grado di permanere in circolo permettendo l'acquisizione di immagini nitide con una somministrazione minima del mezzo gadolinato riducendo in tal modo i rischi legati alla tossicità del metallo. E' interessante anche notare che l'eliminazione preferenziale di questo mezzo appare essere esclusivamente renale; il mezzo, nonostante la presenza di un'unità galattosidica, non viene sequestrato da un tessuto epatico sano. Indubbiamente merita approfondire l'utilizzo di tale sonda in ambito patologico.

Test immunologici condotti su Chitlac ne hanno dimostrato l'alta tollerabilità *in vivo*, permettendone l'utilizzo negli studi su modelli animali di artrite indotta tramite la tecnica dell'*imaging* ottico. Primi esperimenti condotti tramite iniezione intrarticolare del Chitlac hanno evidenziato un effetto discriminante del polimero verso le articolazioni patologiche. Tale aspetto risulta di estrema rilevanza nella valutazione di un mezzo diagnostico idoneo per l'*imaging* molecolare.

Un successivo esperimento condotto tramite trattamento endovenoso dello stesso polimero, ha permesso di valutare l'applicabilità della sonda in clinica. Tale via di somministrazione risulta infatti meglio accettata dal paziente. Dopo una settimana dall'iniezione nell'animale artritico, la sonda risulta ancora visibile nell'articolazione, il polimero dunque appare non subire un significativo sequestro da parte del fegato, come poteva essere ipotizzabile dai risultati ottenuti *in vitro*. Per meglio valutare quest'ultimo punto sarà necessario replicare l'esperimento aggiungendo un animale sano di riferimento ed effettuare successivi studi metabolici.

APPENDICE: Nuove Tecniche di *Imaging* Tissutale: Misure Preliminari

Nella fase finale di questo progetto di dottorato è stata avviato a titolo esplorativo anche uno studio per la messa a punto di nuove tecniche per l'analisi patologie cartilaginee mediante spettroscopia e microscopia Raman. Questa è una tecnica potente che è stata ampiamente utilizzata nelle ultime due decadi per studiare campioni biologici, in quanto può fornire informazioni biochimiche sui tessuti, ma anche su cellule, in relazione anche all'effetto di molecole non endogene. La tecnica si basa sul riconoscimento delle specie chimiche presenti in un campione. Ciascuna molecola è in grado di causare una variazione di energia tra la luce incidente e la luce dispersa dal campione (effetto Raman). La variazione di energia corrisponde a transizioni vibro-rotazionali ed è quindi univocamente definita per ciascuna molecola. Integrando quindi uno spettrometro Raman con un microscopio ottico, la microscopia Raman può permettere di studiare la composizione a livello molecolare di campioni di tessuti con una risoluzione fino ai 200 nm lateralmente e 500 nm verticalmente. Dalla raccolta degli spettri in più punti è possibile eseguire una completa mappatura spettrale del campione analizzato. L'interesse per l'analisi del tessuto cartilagineo con questa tecnica innovativa risiede nella possibilità di individuare variazioni a livello di composizione

molecolare dei tessuti trattati. Inoltre, tale tecnica è attualmente in fase di sviluppo per il suo utilizzo in clinica, sebbene al momento la ricerca in questo senso sia ancora agli albori.

In Figura (4.9) è riportata l'immagine al microscopio ottico (a sinistra) di una sezione di cartilagine articolare di maiale in confronto all'immagine di *protein cluster analysis* (mappa bidimensionale Raman, a destra) ottenuta dall'elaborazione degli spettri Raman sulla stessa sezione. Da essa si riesce ad evidenziare il diverso contenuto di proteine all'interno della sezione (in rosso sono segnalate le zone a più alto contenuto proteico, mentre in blu sono segnalate quelle a più basso contenuto proteico).

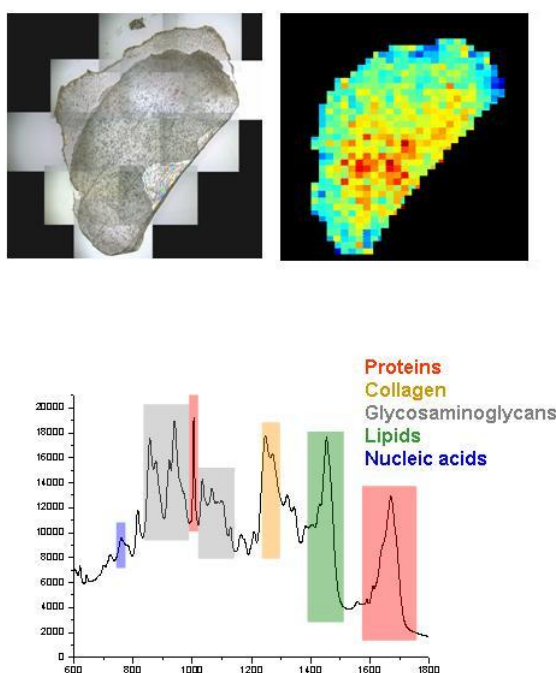


Figura 4.9. Analisi della cartilagine tramite microscopia Raman. Sopra, mappatura dell'intera sezione cartilaginea effettuata registrando uno spettro Raman ogni 100 μm . Sotto, spettro medio della sezione cartilaginea.

In questa prima serie di misure la preparazione del campione non aveva garantito una rigorosa costanza di spessore. Il diverso contenuto proteico è quindi soltanto apparente, essendo semi-quantitativamente correlato allo spessore del campione. Pertanto, le differenze individuabili all'interno del tessuto non sono da considerarsi significative, indicando invece un'omogeneità complessiva della sezione analizzata.

Questo ci ha permesso, in un esperimento successivo, di poter scegliere arbitrariamente una zona di analisi più piccola al fine di entrare nel dettaglio della composizione tissutale. In Figura 4.10 è mostrata la mappa a pseudo-colore derivata da un'analisi statistica effettuata dal software.

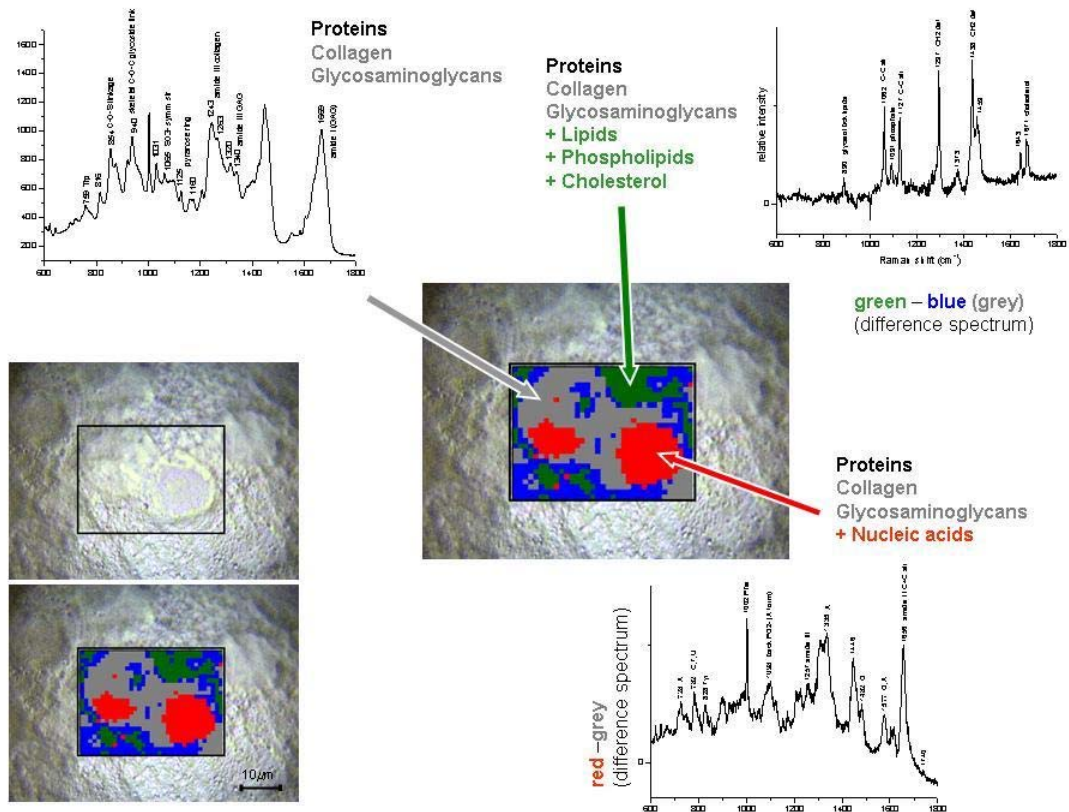


Figura 4.10. Mappatura di una porzione di tessuto ottenuta rilevando un pixel per micron. Al centro la mappatura a pseudo-colore; le frecce rapportano le diverse zone ai rispettivi spettri medi (zona grigia) o differenze tra gli spettri medi (zona verde e rossa).

Tale analisi permette l'individuazione di zone presentanti un certo grado di somiglianza relativamente al contenuto macromolecolare. Zone significativamente diverse tra loro vengono colorate diversamente. Effettuando lo spettro medio di ciascuna zona e sottraendo gli spettri medi tra loro simili si è in grado di apprezzare le differenze tra le diverse zone. Ad esempio, sottraendo la zona grigia dalla zona rossa (v. Figura 4.9) si evidenzia un maggior contenuto di acidi nucleici nella zona rossa, indicando la localizzazione del nucleo. Si può notare in realtà come, conseguentemente alla mancata fissazione delle cellule, non si abbia una zona nucleare ben circoscritta. Sottraendo invece lo spettro medio della zona grigia (o blu) da quello della zona verde (v. Figura 4.9), si nota un maggior contenuto in lipidi, colesterolo e fosfolipidi all'interno della zona verde. E' interessante notare come questa zona (indicata dalla freccia verde) sia localizzata attorno alla zona ricca in collagene e glicosaminoglicani (e dunque attorno alla matrice). Ciò potrebbe essere conseguenza della morte cellulare in corso; tuttavia, in tal caso ci si aspetterebbe una localizzazione più in

prossimità della singola cellula che sta andando incontro a necrosi. Il dato risulta dunque interessante poiché è noto un accumulo di colesterolo e lipidi nella matrice della cartilagine articolare di topi a cui è stata indotta l'artrite (Hamer, 2002).

Va comunque sottolineato come queste immagini siano assolutamente preliminari, sia per la preparazione del campione che per il trattamento sperimentale e l'analisi delle immagini. interessante poiché è noto un accumulo di colesterolo e lipidi nella matrice della cartilagine articolare di topi a cui è stata indotta l'artrite (Hamer, 2002).

Va comunque sottolineato come queste immagini siano assolutamente preliminari, sia per la preparazione del campione che per il trattamento sperimentale e l'analisi delle immagini.

CONCLUSIONI

E

PROSPETTIVE FUTURE

Obiettivo del presente progetto di dottorato è stato la messa a punto di un sistema diagnostico per immagini che permetta di individuare precocemente e con alta specificità la presenza di patologie osteoarticolari, in particolare l'artrite reumatoide.

L'attività si è rivolta verso l'identificazione/progettazione di composti saccaridici in grado di legarsi a *marker* specifici della patologia artritica, alla loro sintesi ed alla coniugazione a mezzi di contrasto, ed all'utilizzo di tali sonde in sistemi diagnostici applicati su modelli cellulari e animali.

In particolare, bersaglio di questi mezzi di contrasto sono le galectine, una classe di proteine appartenente alla famiglia delle lectine in grado di legare con alta selettività unità galattosidiche. La galectina-1 è considerata una proteina che è in grado di regolare negativamente la risposta immune e risulta sottoespressa nei siti di invasione dell'artrite reumatoide. Una somministrazione *in vivo* di questa proteina ha dimostrato di essere in grado di prevenire lo sviluppo di infiammazioni croniche e di migliorare condizioni patologiche come encefalo mieliti autoimmuni, coliti, epatiti ed artriti.

L'aumentata espressione della galectina-3 risulta essere un fattore rilevante per lo sviluppo di patologie artritiche. In particolare, studi riportano che la distribuzione della galectina-3 varia a seconda della tipologia di artrite: in tutta la membrana sinoviale e nei punti di disgregazione della cartilagine e dell'osso di pazienti reumatici, altamente localizzata a livello intracellulare (Ohshima, 2003); sulla superficie di condrociti, prelevati e mantenuti in coltura, di pazienti affetti da osteoartrite (Guèvremont, 2004).

Nel corso del lavoro di tesi sono stati ottenuti coniugati di sonde per la diagnostica per immagini contenenti ramificazioni di galattosio in grado di legarsi con alta selettività alle galectine ed indicare una eventuale variazione dell'espressione di queste. Sono stati intrapresi i test *in vitro* su sistemi acellulari e cellulari di interesse; è stata infine effettuata una prima campagna di test *in vivo*.

Il primo polimero preso in esame come *carrier* di unità di β -galattosio è stato il Chitlac, un derivato del chitosano ottenuto per amminazione riduttiva delle ammine primarie del polimero con il lattosio (Donati, 2005) secondo una procedura già riportata in letteratura (Yalpani, 1984).

In precedenti studi condotti nei nostri laboratori (Donati, 2005), è stato evidenziato che il Chitlac induce aggregazione cellulare quando messo in contatto con colture primarie di condrociti di maiale, portando alla formazione di noduli di considerevoli dimensioni (fino a 0.5-1 mm di diametro). Il risultato dell'analisi dei noduli ha evidenziato che il chitosano modificato con il lattosio non è tossico e stimola la produzione di aggregano e di collagene di tipo II. Per questo motivo il Chitlac è un polimero di estremo interesse, non solo come trasportatore di sonde diagnostiche, ma anche per la sua intrinseca attività biologica.

Per poter valutare l'influenza del grado di lattosilazione di questo polimero sulla sua specificità nel riconoscimento di recettori per unità β -galattosidiche ed i suoi effetti *in vitro*, si è scelto di sintetizzare Chitlac a diversi gradi di sostituzione. In particolare, la strategia sintetica, già nota, è stata sviluppata nel corso di questo lavoro al fine di minimizzare la quantità di riducente, estremamente tossico, ma necessario perché la reazione tra chitosano e lattosio avvenga. I prodotti così ottenuti sono stati caratterizzati in termini di viscosità intrinseca e di solubilità a pH 7.4, due dati estremamente importanti per poter valutare quali campioni siano più idonei ad essere testati per la attività biologica.

Per ottenere diversi sistemi *clusterizzanti* galattosio, si è scelto di utilizzare un altro polisaccaride (il destrano) ed un dendrimero di 6° generazione (il PAMAM). La strategia sintetica utilizzata per il destrano, ha permesso di legare, in modo controllabile, unità di lattosio che presentino entrambi gli anelli piranosidici intatti, diversamente dal Chitlac per la formazione del quale avviene l'apertura dell'anello glucosidico con riduzione a glucitolo. La "controllabilità" del processo è data dalla reazione di carbossimetilazione del destrano e dal fatto che tutti i gruppi carbossimetilenici vengono sostituiti al 100% con lattosio (Dexlac). L'importanza di mantenere il lattosio nella forma chiusa risiede nella maggiore affinità delle galectine per il lattosio, rispetto al monosaccaride galattosio.

Il PAMAM è un dendrimero che presenta 256 ammine primarie, e dunque 256 possibili attacchi di unità β -galattosidiche tramite la reazione di amminazione riduttiva. E' noto che i dendrimeri non sono citotossici e permettono un controllo estremamente preciso delle loro dimensioni nonché della forma e della posizione dei gruppi funzionali, tutte caratteristiche altamente desiderabili per molte applicazioni di tipo biomedico.

Durante questo lavoro siamo riusciti ad ottenere un PAMAM in cui le ammine primarie risultano tutte sostituite dal lattosio e che dunque rappresenta un possibile strumento non solo per *imaging*, ma anche, data la sua natura dendrimerica, per costituire un supporto biologicamente attivo per la veicolazione mirata di farmaci e/o mezzi diagnostici.

Le prime analisi per determinare come la clusterizzazione delle unità galattosidiche possa aumentare le interazioni con le galectine, sono state condotte sul polimero Chitlac. In particolare, studi condotti tramite *Surface Plasmon Resonance* hanno permesso di ottenere un'indicazione sull'affinità del polisaccaride verso galectina-1 e galectina-3. I risultati hanno dimostrato una complessiva affinità del polisaccaride per le galectine, in particolare per la galectina-3. Inoltre, tale affinità risulta dipendente dalla libertà conformazionale: maggiore è la libertà conformazionale del polisaccaride, maggiore è la sua affinità per le galectine.

In virtù di questi risultati sono stati effettuati per la prima volta degli studi *in vitro* utilizzando il Chitlac in soluzione e verificando il suo legame a due tipi cellulari. La linea cellulare HepG2, derivante da epatocarcinoma, è stata scelta come controllo positivo in quanto presenta numerosi recettori per il galattosio (recettori per le asialoglicoproteine). I condrociti primari estratti dalla testa dell'omero di maiale, sono invece da considerarsi il modello cellulare utilizzato al fine di sviluppare sistemi diagnostici per la cartilagine. I condrociti di maiale hanno rappresentato dunque uno strumento per gli studi preliminari che indubbiamente dovranno successivamente essere svolti su condrociti patologici umani.

I primi risultati hanno dimostrato che il Chitlac è in grado di essere internalizzato in entrambe le tipologie cellulari. Questi risultati ci hanno spinto a verificare se il polisaccaride possa in qualche modo alterare la progressione delle cellule all'interno del loro ciclo replicativo. Dalle prove condotte risulta che il Chitlac è sicuramente in grado di perturbare il ciclo cellulare, in particolare delle cellule HepG2. Se, infatti, esso appare favorire la replicazione dei condrociti, nelle cellule epatiche sembra avere un ruolo determinante nell'indurre un fenomeno apoptotico dopo 48 ore dal *washout*.

E' indubbio che tali risultati vadano approfonditi, in particolar modo si suggerisce di verificare l'effetto pro-apoptotico del Chitlac in cellule tumorali e non provenienti dallo stesso tessuto.

Poiché le galectine assumono un ruolo anche all'interno del ciclo cellulare e nei sistemi apoptotici della cellula, in particolare in alcune patologie neoplastiche, sarà altresì importante approfondire se (ed eventualmente in che misura) l'effetto del Chitlac sia correlato con l'interazione del polisaccaridide con questa classe di proteine.

Inoltre, gli stessi esperimenti condotti tramite trattamento con Dexlac e PAMAMlac permetterebbero di stabilire l'importanza del *backbone* di clusterizzazione del galattosio nel produrre tali effetti; mentre il trattamento con Chitlac a diverso grado di sostituzione potrebbe evidenziare il limite di sostituzione al disotto, o al disopra del quale non si osservano tali effetti.

Test *in vivo* hanno dimostrato l'assenza di immunogenicità da parte del Chitlac. Esso è dunque stato coniugato con una sonda attiva all'*imaging* ottico (Cy5.5) e somministrato intra-articolarmente in animali a cui è stata indotta l'artrite. Parallelamente sono state effettuate, in due esperimenti distinti, iniezioni intra-articolari rispettivamente di destranoCy5.5 e chitosanoCy5.5. In entrambi gli esperimenti si osserva un incremento della risposta della sonda legata al Chitlac nell'animale artritico, rispetto all'animale sano. Questa differenza di risposta non è invece evidenziabile nelle articolazioni trattate con destrano o chitosano.

Infine, per poter valutare l'applicabilità della sonda legata al Chitlac, essa è stata iniettata per via endovenosa in un ratto con artrite indotta. Già dopo 5 ore è stato possibile evidenziare la presenza della sonda a livello delle articolazioni, a dimostrazione di un probabile *uptake* a livello epatico del tutto trascurabile. Purtroppo, a causa delle problematiche legate alla reperibilità degli animali non è stato possibile effettuare un esperimento di iniezione endovenosa in un animale sano, né iniezioni endovenose della sonda legata al destrano o al chitosano per verificare i risultati ottenuti intra-articolarmente. Al momento sono in corso analisi immunoistochimiche e valutazioni sul contenuto di molecole infiammatorie delle articolazioni degli animali trattati. Inoltre, verranno condotti studi sul fegato degli stessi animali, al fine di poter escludere effetti del Chitlac su tessuti epatici sani.

L'*imaging* ottico viene attualmente utilizzato solo per gli studi a livello pre-clinico su piccoli animali. Il sistema diagnostico più utilizzato in clinica per la valutazione di patologie infiammatorie è la risonanza magnetica (MRI). Abbiamo voluto modificare delle sonde per MRI (basate su complessi del gadolinio) introducendovi il lattosio, al fine di ottenere una specificità di tali sonde per le patologie che mostrino un'alterazione del contenuto di recettori per il galattosio. In particolare, è stato sintetizzato il *lattit-1-il-Lys-DTPAGd* ed il *lattit-1-il-Lys-AAZTAGd*. L'analisi della rilassività ne ha evidenziato un incremento grazie alla presenza dei numerosi gruppi ossidrilici del gruppo saccaridico. I primi risultati ottenuti *in vivo* su animali sani ha evidenziato un forte miglioramento del contrasto fornito dal *lattit-1-il-Lys-DTPAGd* in confronto all'analogo non lattosilato (Magnevist®). Quindi, la strategia di lattosilazione potrebbe incrementare anche il contrasto di altre sonde che potenti già

presentano una migliore relaxività rispetto al Magnevist®. Inoltre, sarà indubbiamente interessante verificare il comportamento della sonda in un modello animale patologico. Attualmente, è in avanzata fase di realizzazione la “clusterizzazione” delle sonde a base gadolinio sul Chitlac e sul destrano (quale polimero di confronto) per verificare la potenzialità del Chitlac come sonda diagnostica per le patologie artritiche.

BIBLIOGRAFIA

Axford J, "Glycobiology and Medicine: an introduction", *J Royal Soc Med*, **1997**, 90, 260-264

Ahmad, N, "Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-1", *Glycobiology*, **2004**, 14, 817-825

AIFA, "Guida all'uso dei farmaci", **2008**

Aime S, Cabella C, Colombatto S, Geninatti Crich S, Gianolio E, Maggioni F, "Insights into the use of paramagnetic Gd(III) complexes in MR-molecular imaging investigations", *Journal of magnetic resonance imaging*, **2002**, 16, 394-406

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, "Molecular Biology of the Cell", *4a ed*, New York and London: Garland Science, **2002**

Andersson SE, Lexmüller K, Ekström GM, "Physiological characterization of mBSA antigen induced arthritis in the rat I Vascular leakiness and pannus growth ", *J Rheumatol*, **1998**, 25, 1772-1777

André JP, Geraldés CFGC, Martins JA, Merbach AE, Prata MIM, Santos AC, De Lima JJP, Tóth E, "Lanthanide (III) complexes of DOTA-glycoconjugates: a potential new class of lectin-mediated medical imaging agents", *Chem Eur*, **2004**, 10, 5804-5816

Anelli PL, Fedeli F, Gazzotti O, Lattuada L, Lux G, Rebasti F, "l-Glutamic Acid and l-Lysine as Useful Building Blocks for the Preparation of Bifunctional DTPA-like Ligands", *Bioconjugate Chem*, **1999**, 10, 137-140

Asayama S, Mizushima K, Nagaoka S, Kawakami H , "Design of metallo porphyrin-carbohydrate conjugates for new superoxide dismutases mimic cellular recognition", *Bioconjugate Chem*, **2004**, 15, 1360-1363

Baía P, André J P, Geraldes C F G C, Martins J A, Merbach A E, Tóth E , "Lantanide (III) chelates of DTPA Bis(amide)Glycoconjugates: potential imaging agents targeted at the asialoglycoprotein receptor" , *Eur J Inorg Chem* , **2005**, 2005, 2110-2119

Baptiste TA, James A, Saria M, Ochieng J, "Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: Implications in the extracellular functions of the lectin" , *Experimental Cell Research*, **2007**, 313, 652-664

Bathon JM, "Rheumatoid Arthritis Pathophysiology", http://www.hopkins-arthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/rheum_clin_path.html

Bendele A, McComb J, Gould T, McAbee T, Senello G, Chlipala E, Guy M, "Animal models of arthritis: relevance to human disease", *Toxicologic Pathology*, **1999**, 3, 134-142

Berberat PO, Friess H, Wang L, Zhu Z, Bley T, Frigeri L, Zimmermann A, Büchler M W, "Comparative Analysis of Galectins in Primary Tumors and Tumor Metastasis in Human Pancreatic Cancer " , *J Histochem Cytochem*, **2001**, 49, 539-549

Biswal S, Resnick DL, Hoffman JM, Gambhir SS, "Molecular Imaging: integration of molecular imaging into the musculoskeletal imaging practice", *Radiology*, **2007**, 244, 651-671

Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR , "Studies on antigen-induced arthritis in mice III Cell and serum transfer experiments", *J Immunol*, **1977**, 118, 1645-1648

Bremer C, Ntziachristos V, Weissleder R , "Optical-based molecular imaging:contrast agents and potential medical applications" , *Eur Radiol* , **2003**, 13, 231–243

Burstein D, Gray M, "Potential of molecular imaging of cartilage", *Sports Med Arthroscopy Rev*, **2003**, 11, 182-191

Burtea C, Laurent S, Colet J M, Vander Elst L, Muller R N, "Development of new glucosilated derivatives of gadolinium diethylenetriaminepentaceticacid for magnetic resonance angiography", *Investigative radiology*, **2003**, 38, 320-333

Bush PJ, Huntley JS, Brenkel IJ, Hall AC, "The shape of things to come: chondrocytes and osteoarthritis", *Clin Invest Med*, **2003**, 26, 249-51

Chang X, Yamada R, Yamamoto K, "Inhibition of antitrombin by hyaluronic acid may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis", *Arthritis Res Ther*, **2005**, 7, R268-R273

Chen W-T, Mahmood U, Weissleder R, Tung C-H, "Arthritis imaging using a near-infrared fluorescence folate-targeted probe", *Arthritis Res Ther*, **2005**, 7, R310-R317

Cho M, Cummings RD, "Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells I Physical and chemical characterization", *J Biol Chem*, **1995**, 270, 5198-5206

Ciocci A, Buratti L, Di Franco M, Mauceri MT, "L'epidemiologia delle malattie reumatiche: confronto fra i dati italiani e quelli stranieri", *Reumatismo*, **1999**, 51, Suppl 2:201

Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, Werner R, Massaro D, "Sequence of a full-length cDNA for rat lung β -galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin", *Biochemistry*, **1988**, 27, 692-699

Collins BE, Paulson JC, "Cell surface biology mediated by low affinity multivalent protein-glycan interactions ", *Current Opinion in Chemical Biology*, **2004**, 8, 617-625

Cook SE, Park IK, Kim EM, Jeong HJ, Park TG, Choi YJ, Akaike T, Cho CS, "Galactosylated polyethylenimine-graft-poly(vinyl pyrrolidone) as a hepatocyte-targeting gene carrier ", *Journal of Controlled Release*, **2005**, 105, 151-163

Cooke TD, Hurd ER, Jasin HE, Bienenstock J, Ziff M, "Identification of immunoglobulins and complement in rheumatoid articular collagenous tissues", *Arthritis Rheum*, **1975**, 18, 541-551

Crescenzi V, "Introduzione alla Chimica dei Polisaccaridi", *Fidia Advance Biopolymers*, **1994**

Curtet C, Maton, F, Havet T, Slinkin M, Mishra A, Chatal JF, Muller R, "Polylysine-Gd-DTPAn and Polylysine-Gd-DOTAn Coupled to Anti-CEA F(ab')₂ Fragments as Potential Immunocontrast Agents: Relaxometry, Biodistribution, and Magnetic Resonance Imaging in Nude Mice Grafted With Human Colorectal Carcinoma", *Investigative radiology*, **1998**, 33, 752-761

Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, Ripoche M, Poirier F, Wang JL, "Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm", *Glycobiology*, **2002**, 12, 329-337

Davis BG, "Recent developments in glycoconjugates", *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, **1999**, , 3215 – 3237

Davis BG, "Synthesis of glycoproteins", *Chem Rev*, **2002**, 102, 579-601

Debray C, Vereecken P, Belot N, Teillard P, Brion J, Pandolfo M, Pochet R, "Multifaceted role of galectin-3 on human glioblastoma cell motility", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2004**, 325, 1393-1398

Donati I, Stredanska S, Silvestrini G, Vetere A, Marcon P, Marsich E, Mozetic P, Gamini A, Paoletti S, Vittur F, "The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan", *Biomaterials*, **2005**, 26, 987-998

Dumic J, Dabelic S, Flögel M, "Galectin-3: An open-ended story", *Biochimica et Biophysica Acta* , **2006**, 1760, 616–635

Dwek RA, Lellouch AC, and Wormald MR, "Glycobiology: 'The function of sugar in the IgG molecule'", *J Anat*, **1995**, 187, 279-292

Edwards JCW , "The Synovium", In '*Rheumatology*', editors Hochberg MC et al, Mosby, Edinburgh, **2003**, Cap17, 159–168

Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y, "Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity", *J Biol Chem*, **2004**, 279, 34922-34930

El-Gabalawy HS and Wilkins JA, "Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenetic significance to rheumatoid arthritis", *Arthritis Res Ther*, **2004**, 6, 86-89

EP 0707857

EP 1 964 846 A1

Esfand R, Tomalia DA, "Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications ", *Drug Discovery Today* , **2001**, 8, 427-436

eXplore Optics, "Pre-Clinical Optical Molecular Imager" Manuale d'uso, *ART Advanced Research Technologies Inc*

Fischetti F, Durigutto P, Macor P, Marzari R, Carretta R, Tedesco F , "Selective therapeutic control of C5a and the terminal complement complex by anti-C5 single-chain Fv in an experimental model of antigen-induced arthritis in rats", *Arthritis Rheum* , **2007**, 56, 1187-1197

Frizziero L, Frizziero A, "Dalla Viscosupplementazione alla condroprotezione Una review dell'efficacia sintomatica e strutturale", *XVII International Congress on Sports Rehabilitation and Traumatology: Riabilitazione sportiva e chirurgia ortopedica: i protocolli post-operatori*, **2008**

Fukumori T, Kanayama H, Avraham Raz A, "The role of galectin-3 in cancer drug resistance", *Drug Resistance Updates* , **2007**, 10, 101-108

Gabius HJ, "Eukaryotic Glycosylation and Lectins: Hardware of the Sugar Code (Glycocode) in Biological Information Transfer", *Eurekahcom; wwwlectinsde*, **2001**

Gao S, Chen J, Xu X, Ding Z, Yang YH, Hua Z, Zhang J, "Galactosylated low molecular weight chitosan as DNA carrier for hepatocyte-targeting ", *International Journal of Pharmaceutics*, **2003**, 255, 57-68

Glinskii OV, Turk JR, Pienta KJ, Huxley VH, Glinsky VV, "Evidence of porcine and human endothelium activation by cancer-associated carbohydrates expressed on glycoproteins and tumour cells", *J Physiol*, **2003**, 554, 89-99

Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, Steiner G, Rosen A, Zhang C, Ménard HA, Zhou ZJ, Palosuo T, Van Venrooij WJ, Wilder RL, Klippel JH, Schumacher HRJr, El-Gabalawy HS, "Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset", *Arthritis Res*, **2000**, 2, 236–243

Greco C, Vona R, Cosimelli M, Matarrese P, Straface E, Scordati P, Giannarelli D, Casale V, Assisi D, Mottolese M, Moles A, Malorni W , "Cell surface overexpression of galectin-3 and the presence of its ligand 90k in the blood plasma as determinants in colon neoplastic lesions", *Glycobiology* , **2004**, 14, 789-792

Guévremont M, Martel-Pelletier J, Boileau C, Liu F-T, Richard M, Fernandes J-C, Pelletier J-P, Reboul P, "Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes: a potential substrate for collagenase-3", *Ann Rheum Dis*, **2004**, 63, 636-643

Hadler NM, "A pathogenetic model for erosive synovitis: lessons from animal arthritides", *Arthritis Rheum*, **1976**, 19, 256-266

Haltiwager RS, Hill RL, "The ligand binding specificity and tissue localization of rat alveolar macrophage lectin", *J Biol Chem*, **1986**, 261, 15696-15702

Hamer E R, Apfel MIR, Carvalho JJ, Pereira MJS, Levy RA, "Evaluation of the cholesterol influence in type II collagen–induced arthritis in DBA/1J mice: an autoradiographic study", *J Cell Mol Med*, **2002**, 6, 407-414

Hansch A, Frey O, Sauner D, Hilger I, Haas M, Malich A, Brauer R, Kaiser WA, "In vivo imaging of experimental arthritis with near-infrared fluorescence", *Arthritis Rheum*, **2004**, 50, 961-967

Hardingham TE, Perkins SJ, Muir H, "Molecular conformations in proteoglycan aggregation", *Biochem Soc Trans*, **1983**, 11, 128-130

He J, Baum LG, "Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death", *J Biol Chem*, **2004**, 279, 4705-4712

Hoffman JM, Gambhir SS, "Molecular Imaging: the vision and opportunity for radiology in the future", *Radiology*, **2007**, 244, 39-47

Hokama A, Mizoguchi E, Sugimoto K, Shimomura Y, Tanaka Y, Yoshida M, Rietdijk S T, de Jong Y P, Snapper S B, Terhorst C, Blumberg R S, Mizoguchi A, "Induced reactivity of intestinal CD4⁺ T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation", *Immunity*, **2004**, 20, 681-693

Huang M, Ma Z, Khor E, Lim L-Y, "Uptake of FITC-Chitosan Nanoparticles by A549 Cells", *Pharmaceutical Research*, **2002**, 19, 1488-1494

Huflejt M E, Jordan E T, Gitt M A, Barondes S H, Leffler H, "Strikingly different localization of galectin-3 and galectin-4 in human colon adenocarcinoma T84 cells Galectin-4 is localized at sites of cell adhesion", *J Biol Chem*, **1997**, 272, 1429-14303

Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ, "Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage", *OsteoarthritisCartilage*, **2002**, 10, 564-572

Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, Okamoto S, Sawada T, Raz A, Kubo T, "Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms", *Cancer*, **1999**, 85, 2475-2484

Inufusa H, Nakamura M, Adachi T, Aga M, Kurimoto M, Nakatani Y, Wakano T, Miyake M, Okuno K, Shiozaki H, Yasutomi M, Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis, *International Journal of Oncology*, **2001**, 19, 913-919

Jain RK, "Transport of Molecules in the Tumor Interstitium: A Review", *Cancer Res*, **1987**, 47, 3039-3051

Janelle-Montcalm A, Boileau C, Poirier F, Pelletier JP, Guévremont M, Duval N, Martel-Pelletier J, Reboul P, "Extracellular localization of galectin-3 has a deleterious role in joint tissues", *Arthritis Res Ther*, **2007**, 9, R20

Jensen-Jarolim E, Neumann C, Oberhuber G, Gscheidlinger R, Neuchrist C, Reinisch W, Zuberi RI, Penner E, Liu FT, Boltz-Nitulescu G, "Anti-Galectin-3 IgG autoantibodies in patients with Crohn's disease characterized by means of phage display peptide libraries", *J Clin Immunol*, **2001**, 21, 348-356

Jia S, Wang JL, "Carbohydrate binding protein 35: complementary DNA sequence reveals homology with proteins of the heterogeneous nuclear RNP", *J Biol Chem*, **1988**, 263, 6009-6011

John CM, Leffler H, Kahl-Knutsson B, Svensson I, Jarvis GA, "Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer", *Clin Cancer Res*, **2003**, 9, 2374-2383

Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D, "Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease", *Pathophysiology*, **2005**, 12, 167-81

Kasai K, Hirabayashi J, "Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes", *J Biochem*, **1996**, 119, 1-8

Khaldoyanidi KS, Glinsky VV, Sikora L, Glinskii AB, Mossine VV, Quinn TP, Glinsky GV, Sriramarao P, "MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions", *J Biol Chem*, **2003**, 278, 4127-4134

Kim TH, Park IK, Nah JW, Choi YJ, Cho CS, "Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier ", *Biomaterials*, **2004**, 25, 3783-3792

Klasen IS, Donselaar IG, Ladestein RM, van den Berg WB, Benner R, "Joint inflammations and flare-up reactions in mice induced by a helper T cell clone", *Agents Actions*, **1986**, 19, 331-334

Klein P, Pawson T, Tyers M, "Mathematical Modeling Suggests Cooperative Interactions between a Disordered Polyvalent Ligand and a Single Receptor Site", **2003**, 13, 1669-1678

Kobayashi K, Kobayashi A, Akaike T , "Culturing hepatocytes on lactose-carrying polystyrene layer via asialoglycoprotein receptor-mediated interactions", *Methods in Enzymology; Y C Lee, R T Lee, Eds; Academic Press: San Diego, CA*, **1994**, 247, 409-18

Kobayashi K, Yoshida T, Takahashi K, Hattori M, "Modulation of the T cell response to beta-lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran", *Bioconjug Chem*, **2003**, 14, 168-176

Köping-Höggård M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Vårum KM, Artursson P, "Chitosan as a nonviral gene delivery system Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo", *Gene Ther*, **2001**, 8, 1108-1121

Krześlak A, Lipińska A, "Galectin-3 as a multifunctional protein, *Cellular and Molecular Biology Letters*, **2004**, 9, 305-328

Kubota N, Tatsumoto N, Sano T, Toya K, "A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents", *Carbohydr Res*, **2000**, 324, 268-274

Kuettner KE, Aydelotte MB, Thonar EJ, "Articular cartilage matrix and structure: a minireview", *J Rheumatol Suppl* , **1991**, 27, 46-48

Lane CF , "Sodium cyanoborohydride — a highly selective reducing agent for organic functional groups", *Synthesis*, **1975**, 3, 135-146

Langereis S, de Lussanet QG, van Genderen MHP, Backes WH, Hackeng TM, van Engelshoven JMA, Meijer EW, "Towards target-specific molecular imaging of angiogenesis with Gd-DTPA-based dendritic architectures", *PolMaterSciEng*, **2004**, 91, 56-57

Lee RT, Lee YC, "Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction", *Glycoconjugate J*, **2000**, 17, 543-551

Lens JW, van den Berg WB, van de Putte LB, Zwarts WA, "Flare of antigen-induced arthritis in mice after intravenous challenge Kinetics of antigen in the circulation and localization of antigen in the arthritic and noninflamed joint", *Arthritis Rheum*, **1986**, 29, 665-674

Leppänen A, Stowell S, Blixt O, Cummings RD, "Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha 2, 3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetylglucosamine units on surfacebound extended glycans", *J Biol Chem*, **2005**, 280, 5549-5562

L'Hermette MF, Tourny-Chollet C, Polle G, Dujardin FH, "Articular Cartilage, Degenerative Process, and Repair: Current Progress", *Int J Sports Med*, **2006**, 27, 738-744

Lim Y, Lee DY, Lee S, Park SY, Kim J, Cho B, Lee H, Kim HY, Lee E, Song YW, Jeoung DI, "Identification of autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus", *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**, 295, 119-124

Lipsky PE, "Why does rheumatoid arthritis involve the joints?", *N Engl J Med*, **2007**, 356, 2419-2420

Lis H, Sharon N, "Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition", *Chem Rev*, **1998**, 98, 637-674

Loeser RF, "Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide", *Arthritis Rheum*, **2006**, 54, 1357–1360

López-Lucendo M F, Solís D, André S, Hirabayashi J, Kasai K, Kaltner H, Gabius H, Romero A, "Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterization of the structural changes induced by singesite mutation and their impact in the thermodynamics of ligand binding", *J Mol Biol*, **2004**, 343, 957-970

Ma Z, Lim LY , "Uptake of Chitosan and Associated Insulin in Caco-2 Cell Monolayers: A Comparison Between Chitosan Molecules and Chitosan Nanoparticles ", *Pharmaceutical Research*, **2003**, 20, 1812-1819

MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M, Rolland AP, "Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery ", *Journal of Controlled Release*, **1998**, 56, 259-272

Majeed M, McQueen F, Yeoman S, McLean L , "Relationship between serum hyaluronic acid level and disease activity in early rheumatoid arthritis", *Ann Rheum Dis*, **2004**, 63, 1166-1168

Manicour DH, Devogelaer JP, Thonar EJMA, El Hajjaji H, "Products of cartilage metabolism" in "Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism", *Ed by Robins SP, Siebel MJ, and Bilezikian JP, Academic Press, 1999*

Mansouri S, Cuie Y, Winnik F, Shi Q, Lavigne P, Benderdour M, Beaumont E, Fernandes JC, "Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy ", *Biomaterials*, **2006**, 27, 2060-2065

MarconP , Marsich E, Vertere A, Mozetic P, Campa C, Donati I, Vittur F, Gamini A, Paoletti S , "Galectin-1 mediates interactions between chondrocytes and a lactose-modified chitosan", *Biomaterials*, **2005**, 26, 4975-84

Marsich E, Borgogna M, Donati I, Mozetic P, Strand BL, Salvador SG, Vittur F, Paoletti S, "Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: a bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation", *J Biomed Mater Res A*, **2008**, 84, 364-376

Marzari R, Sblattero D, Macor P, Fischetti F, Gennaro R, Marks JD, Bradbury A, Tedesco F, "The cleavage site of C5 from man and animals as a common target for neutralizing human monoclonal antibodies: in vitro and in vivo studies", *Eur J Immunol*, **2002**, 32, 2773-2782

Mehvar R, "Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives", *Curr Pharm Biotechnol*, **2003**, 4, 283-302

Mercer N, Ahmed H, McCarthy AD, Etcheverry SB, Vasta GR, Cortizo AM, "AGE-R3/galectin-3 expression in osteoblast-like cells: regulation by AGEs", *Mol Cell Biochem*, **2004**, 266, 17-24

Mizuno M, Nishikawa K, Goodfellow RM, Piddlesden SJ, Morgan BP, "The effects of functional suppression of a membrane-bound complement regulatory protein, CD59, in the synovial tissue in rats", *Arthritis Rheum*, **1997**, 40, 527-573

Moiseeva EV, Rapoport EM, Bovin NV, et al, "Galectins as markers of aggressiveness of mouse mammary carcinoma: towards a lectin target therapy of human breast cancer", *Breast Cancer Research and Treatment*, **2005**, 91, 227-241

Monach P, Hattori K, Huang H, Hyatt E, Morse J, Nguyen L, Ortiz-Lopez A, Wu HJ, Mathis D, Benoist C, "The K/BxN mouse model of inflammatory arthritis: theory and practice", *Methods Mol Med*, **2007**, 136, 269-282

Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A, Kim HR, "Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis", *Am J Pathol*, **2001**, 159, 1055-1060

- Moreland LW , “Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action”, *Arthritis Res Ther*, **2003**, 5, 54-67
- Morris S, Ahmad N, André S, Kaltner H, Gabius H-J, Brenowitz M, Brewer F, "Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7", *Glycobiology*, **2003**, 14, 293-300
- Mozetic P, "Tissue engineering per l'osteoarticolare: dal biomateriale alla risposta Cellulare", *Tesi di Dottorato* , **2007**
- Murata J, Ohya Y, Ouchi T, "Possibility of application of quaternary chitosan having pendant galactose residues as gene delivery tool", *Carbohydrate Polymers*, **1996**, 29, 69-74
- Murata J, Ohya Y, Ouchi T, "Design of quaternary chitosan conjugate having antennary galactose residues as a gene delivery tool", *Carbohydrate Polymers*, **1997**, 32, 105-109
- Muzzarelli RAA, Tanfani F, Emanuelli M, Mariotti S, "N-(carboxymethylidene)chitosans and N-(carboxymethyl)chitosans: Novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate", *Carbohydr Res* , **1982**, 107, 199-214
- Neidhart M, Zaucke F, von Knoch R, Jüngel A, Michel B A, Gay R E, Gay S , "Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein", *Ann Rheum Dis*, **2005**, 64, 419-424
- Nix RM, Queen Mary, University of London Web Site, <http://www.chemqmulacuk/surfaces/scc/scat3htm>, ultimo aggiornamento, giugno **2003**; accesso, da settembre 1997
- Notingher I, "Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors", *Sensors*, **2007**, 7, 1343-1358
- Nugent J, Jain RK, "Extravascular diffusion in normal and neoplastic tissues", *Cancer Res*, **1984**, 44, 238-244
- Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA Kyburz D, Hirt A, Klinzing S, Michel BA, Gay RE, Liu F-T, Gay S and Neidhart M , “Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum*, **2003**, 48, 2788–2795

Olofsson P, Holmdahl R , "Pristane-induced arthritis in the rat", *Methods Mol Med*, **2007**, 136, 255-268

Ortega N, Behonick DJ, Colnot C, Cooper DNW, Werb Z, "Galectin-3 is a downstream regulator of matrix metalloproteinase-9 function during endochondral bone formation", *Mol Biol Cell*, **2005**, 16, 3028-3039

Park JS, Han TH, Lee KY, Han SS, Hwang JJ, Moon DH, Kim SY, Cho YW, "N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release ", *Journal of Controlled Release*, **2006**, 115, 37-45

Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini C, Pandolfi M, Ledda L, Di Loreto C, Damante G, Tell G, "Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2003**, 302, 545-553

Perillo NL, Marcus ME, Baum LG, "Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death", *J Mol Med*, **1998**, 76, 402-412

Plaas AH, Sandy JD, Muir H, "Proteoglycan aggregate formation by articular chondrocyte. Decrease in link-protein synthesis during culture", *Biochem J*, **1983**, 214, 855-864

Puglisi F, Minisini A M, Barbone F, Intersimone D, Aprile G, Puppini C, Damante G, Paron I, Tell G, Piga A, Di Loreto C, "Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma", *Cancer Letters*, **2004**, 212, 233-239

Rabinovich GA, "Galectin-1 as a potential cancer target", *British Journal of Cancer*, **2005**, 92, 1188-1192

Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J and Chernajovsky Y, "Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis", *J Exp Med, The Rockefeller University Press*, **1999**, 190, 385-397

Rabinovich GA, Rubinstein N, Matar P, Rozados V, Gervasoni S, Scharovsky GO, "The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression", *Cancer Immunol Immunother*, **2002**, 50, 597–603

Rahman M, "Introduction to Flow Cytometry", *AbD Serotec*, **2006**

Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Hallmanns G, Vadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ, "Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum*, **2003**, 48, 2741-2749

Rebizak R, Schaefer M, Dellacherie E, "Polymeric Conjugates of Gd³⁺-Diethylenetriaminepentaacetic Acid and Dextran 2 Influence of Spacer Arm Length and Conjugate Molecular Mass on the Paramagnetic Properties and Some Biological Parameters", *Bioconjugate Chemistry*, **1998**, 9, 94-99

Rejman J, Bragonzi A, Conese M, "Role of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis in Gene Transfer Mediated by Lipo- and Polyplexes", *Molecular Therapy*, **2005**, 12, 468–474

Roth A, Mollenhauer J, Wagner A, Fuhrmann R, Straub A, Venbrocks RA, Petrow P, Bräuer R, Schubert H, Ozegowski J, Peschel G, Müller PJ, Kinne RW, "Intra-articular injections of high-molecular-weight hyaluronic acid have biphasic effects on joint inflammation and destruction in rat antigen-induced arthritis", *Arthritis Research & Therapy*, **2005**, 7, R677-R686

Sashiwa H, Shigemasa Y, "Chemical modification of chitin and chitosan 2 : preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins", *Carbohydr Polym*", **1999**, 39, 127-138

Seki N, Sudo Y, Yoshioka T et al, "Type-II induced murine arthritis Induction and preparation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity", *J Immunol* , **1988**, 140, 1477–1484

Semwogerere D, Weeks ER, "Confocal microscopy", *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, **2005**, DOI: 101081/E-EBBE-120024153

Shahbazi-Gahrouei D, Williams M, Rizvi S, Allen BJ, "In vivo studies of Gd-DTPA monoclonal antibody and Molecular MRI With Targeted Contrast Agents 523 gd-porphyrins: Potential magnetic resonance imaging contrast agents for melanoma", *J Magn Reson Imaging*, **2001**, 14, 169-74

Shekhar MPV, Nangia-Makker P, Tait L, Miller F, Raz A, Functional Analysis of Galectin-3 in Breast Epithelial-Endothelial Interactions, *American Journal of Pathology*, **2004**, 165, 1931-1941

Shikata F, Tokumitsu H, Ichikawa H, Fukumori Y, "In vitro cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2002**, 53, 57-63

Shou J, Bul CM, Li L, et al, "Identification of blood biomarkers of rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen-induced arthritis model", *Arthritis Res Ther*, **2006**, 8, R28

Smith RL, "Degradative enzymes in osteoarthritis", *Front Biosci*, **1999**, 4, 704-712

Sorlier P, Denuzière A, Viton C, Domard A, "Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan", *Biomacromolecules*, **2001**, 2, 765-772

Steenvoorden MC, Huizinga TWJ, Verzijl N, Bank RA, Runday HK, Luning HAF, Lafeber FPJ, Toes REM, DeGroot J, "Activation of Receptor for Advanced Glycation End Products in Osteoarthritis Leads to Increased Stimulation of Chondrocytes and Synoviocytes", *Arthritis and Rheumatism*, **2006**, 54, 253-263

Stefenelli N, Klotz H, Engel A, Bauer P, "Serum sialic acid in malignant tumors, bacterial infections, and chronic liver diseases", *J Cancer Res Clin Oncol*, **1985**, 109, 55-59

Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U, "Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage", *Arthritis Res Ther*, **2007**, 9, 213

Stockwell RA, "The cell density of human articular and costal cartilage", *J Anat*, **1967**, 101, 753-763

Symons A, Cooper DN, Barclay AN, "Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1", *Glycobiology*, **2000**, 10, 559-563

Tabata Y, Kawai T, Murakami Y, Ikada Y, "The Electric Charge Influence of Dextran Derivatives on Their Tumor Accumulation after Intravenous Injection", *Drug Deliv*, **1997**, 4, 213-221

Tabata Y, Noda Y, Matsui Y, Ikada Y, "Targeting of tumor necrosis factor to tumor by use of dextran and metal coordination", *Journal of Controlled Release*, **1999**, 59, 187-196

Takakura Y, Takagi A, Hashida M, Sezaki H, "Disposition and Tumor Localization of Mitomycin C–Dextran Conjugates in Mice", *Pharm Res*, **1987**, 4, 293-300

Tarrow AB, Pulaski EJ, "Reactions in man from infusion with dextran", *Anesthesiology*, **1953**, 14, 359-366

Tempany CMC, McNeil BJ, "Advances in Biomedical Imaging", *JAMA*, **2001**, 285, 562-567

Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB, "Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine", *Infect Immun*, **2003**, 71, 3875-3884

Uesaka S, Nakayama Y, Shirai Y, Yoshihara K, "Serum and synovial fluid levels of chondroitin sulfate in patients with osteoarthritis of the knee joint", *J Nippon Med Sch*, **2001**, 68, 165-170

US 4822594

Van Boekel MAM, Vossenaar ER, van den Hoogen FHJ, van Venrooij WJ, "Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value", *Arthritis Res*, **2002**, 4, 87-93

Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J, "Essentials of Glycobiology", editors Plainview (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1999**

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, "Essentials of Glycobiology ", 2a ed, editors Plainview (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2008**

Vasselon T, Hailman E, Thieringer R, Detmers PA, "Internalization of Monomeric Lipopolysaccharide Occurs after Transfer out of Cell Surface CD14", *J Exp Med*, **1999**, 190, 509-521

Vera DR, Wallace AM, Hoh CK, Mattrey, RF, "A synthetic macromolecule for sentinel node detection: (99m)Tc-DTPA-mannosyl-dextran", **2001**, 42, 951-959

Vrasidas I, André S, Valentini P, Böck C, Lensch M, Kaltner H, Liskamp RM, Gabius HJ, Pieters RJ, "Rigidified multivalent lactose molecules and their interactions with mammalian galectins: a route to selective inhibitors", *Org Biomol Chem*, **2003**, 7, 803-810

Wang JY, Roehrl MH, "Glycosaminoglycans are a potential cause of rheumatoid arthritis", *PNAS*, **2002**, 99, 14362-14367

Watson M, Rudd PM, Bland M, Dwek RA, Axford JS, "Sugar printing rheumatic diseases: A potential method for disease differentiation using immunoglobulin G oligosaccharides", *Arthritis Rheum*, **1999**, 42, 1682-1690

Wipke BT, Wang Z, Nagengast W, Reichert DE, Allen PM, "Staging the initiation of autoantibody-induced arthritis: a critical role for immune complexes", *J Immunol*, **2004**, 172, 7694-7702

WO 99/01160

Wong M, Wuethrich P, Eggli P, Hunziker E, "Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: A new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography", *Journal of Orthopaedic Research*, **1996**, 14, 424-432

Woodruff TM, Strachan AJ, Dryburgh N, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM, "Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat", *Arthritis Rheum*, **2002**, 46, 2476-2485

Wunder A, Straub R H, Gay S, Funk J, Müller-Ladner U, "Molecular imaging: novel tools in visualizing rheumatoid arthritis", *Rheumatology*, **2005**, 44, 1341–1349

Wunder A, Tung C-H, Müller-Ladner U, Weissleder R, Mahmood U, "In vivo imaging of protease activity in arthritis", *Arthritis Rheum*, **2004**, 50, 2459–2465

Yalpani M, Hall LD, "Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications III Formation of branched-chain, soluble chitosan derivatives", *Macromolecules*, **1984**, 17, 272-281

Yang T-C, Chou C-C, Li C-F, "Preparation, water solubility and rheological property of the N-alkylated mono or disaccharide chitosan derivatives", *Food Res Int*, **2002**, 35, 707-713

Yin C, Liao K, Mao H, Leong KW, Zhuod R, Chan V, "Adhesion contact dynamics of HepG2 cells on galactose-immobilized substrates", *Biomaterials*, **2002**, 24, 837-850

Yoshida M, Sai S, Marumo K, Tanaka T, Itano N, Kimata K and Fujii K, "Expression analysis of three isoforms of hyaluronan synthase and hyaluronidase in the synovium of knees in osteoarthritis and rheumatoid arthritis by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction", *Arthritis Res Ther*, **2004**, 6, R514-R520

Yu LG, Andrews N, Zhao Q, McKean D, Williams JF, Connor LJ, Gerasimenko OV, Hilkens J, Hirabayashi J, Kasai K, Rhodes JM, "Galectin-3 interaction with Thomsen-

Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion", *J Biol Chem*, **2007**, 282, 773-781

Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM, "Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis", *Rheumatology*, **2006**, 45, 20–25

Zhu W, Mow VC, Koob TJ, Eyre DR, "Viscoelastic shear properties of cartilage and the effects of glycosidase treatments", *J Orthop Res*, **1993**, 11, 771-781

Zhu W, Ochieng J, "Rapid Release of Intracellular Galectin-3 from Breast Carcinoma Cells by Fetuin", *Cancer Research* , **2001**, 61, 1869-1873

Zou J, Glinsky VV, Landon LA, Matthews L, Deutscher SL, "Peptides specific to the galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion", *Carcinogenesis*, **2005**, 26, 309-318

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno dato un attivo contributo allo svolgimento di questo lavoro; primo fra tutti, il prof. Paoletti per avermi guidata in questi anni nello studio e nell'elaborazione di questa tesi.

Un doveroso ringraziamento va rivolto a Bracco Imaging ed in particolare al dott. Maiocchi e alla dott. Poggi per le immagini MRI elaborate al Centro Ricerche Bracco di Colletterto Giacosa.

Le analisi NMR sono state eseguite presso i laboratori del Centro di Biomedicina Molecolare (CBM); ringrazio per questo Nicola D'Amelio per la pazienza nell'istruirmi sul significato degli spettri ottenuti. Grazie anche ad Andreina Toraldo e Chiara Vatta per aver dato un notevole aiuto nella sintesi e caratterizzazione dei derivati polisaccaridici.

Desidero esprimere la mia riconoscenza a Francesca Paoletti dell'Istituto EBRI di Roma, per l'ospitalità datami in occasione delle prove effettuate al BIAcore e per l'elaborazione dei dati.

Ringrazio inoltre, Sabrina Semeraro ed Eleonora Marsich per il sostegno datomi nei trattamenti *in vitro* e tutti i ragazzi del gruppo del prof. Paoletti per la sempre pronta assistenza tecnica.

Le analisi citofluorimetriche sono state condotte presso i laboratori della Fondazione Callerio diretta dal prof. Sava. Per queste ringrazio in particolare la dott. Sabrina Pacor, il cui prezioso apporto ha aperto numerosi ed entusiasmanti interrogativi.

Un grazie al dott. Fabio Fischetti, dell' Unità Clinica Operativa di Medicina Clinica, per il reperimento e trattamento degli animali per l'*imaging* ottico e la dott. Chiara Garrovo per le immagini ottenute all'Optical Imager presso il CBM.

I test di immunogenicità sono stati effettuati presso i laboratori del prof. Colombatti al CRO di Aviano dalla dott. Carla Danussi, che ringrazio sentitamente.

Un ringraziamento anche alla dott. Grandolfo della SISSA per le immagini al microscopio confocale e al prof. Vittur che ha eseguito le sezioni di cartilagine per le analisi Raman effettuate dal dott. Bonifacio del dipartimento Materiali e Risorse Naturali.

Infine vorrei ricordare tutti i ragazzi del gruppo Bracco Imaging, Adele, Andreina, Mila, Nicola e Valentina, con cui in questi anni ho condiviso gli spazi, e non solo. Un ringraziamento particolare a Cristiana Campa, per avermi fatto da guida e senza la quale

niente di tutto ciò avrebbe potuto avere inizio, a Marco Rossi, il miglior collega che si possa desiderare e ad Anna Coslovi per l'enorme aiuto ricevuto nella realizzazione di questa tesi e per avermi sempre sostenuta ed incoraggiata, soprattutto nei momenti difficili.