

SAGGI DI IMMUNOTOSSICITÀ SULLA LINEA CELLULARE MACROFAGICA THP-1 M0 IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON PBDE-47

Rapporto Tecnico – Luglio 2020

Autori: Alessia Maria Sampino, Alessandra Longo, Valeria Longo e
Paolo Colombo

Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica – IRIB
del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Via Ugo La Malfa 153

90146 Palermo

Italia

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
PROTOCOLLO DIFFERENZIAMENTO LINEA CELLULARE MONOCITARIA THP-1 IN LINEA CELLULARE MACROFAGICA THP-1 M0	4
SAGGI DI CITOTOSSICITÀ	4
2.1. SAGGIO LDH.....	4
2.2. SAGGIO MTS.....	7
ANALISI GENOTOSSICA.....	10
3.1. SAGGIO COMET	10

INTRODUZIONE

I polibromo difenil eteri (PBDE) sono inquinanti organici persistenti che vengono aggiunti a numerosi prodotti in commercio come plastiche, tessili, prodotti elettronici, vestiti o mobili, per prevenire incendi accidentali. I PBDE fanno parte di un gruppo più grande di sostanze chimiche note come ritardanti di fiamma bromurati (BFR) (Longo V, 2018).

La produzione dei PBDE ha inizio nel 1976 sotto differenti nomi, ne esistevano principalmente tre formule commerciali note come penta-, octa-, e deca-PBDE.

Dal momento che l'utilizzo dei ritardanti di fiamma è andato via via incrementando e che molti di questi composti sono risultati persistenti, bioaccumulabili e tossici, la Commissione Europea ha incaricato l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) di indagare sui fattori di rischio per la salute umana, indotti dalla contaminazione degli alimenti da parte dei ritardanti di fiamma bromurati.

Risultati di altri progetti di ricerca su modelli animali mostrano immunotossicità indotta dai PBDE, comportando un aumento della suscettibilità ad infezioni. In particolar modo, recenti pubblicazioni mostrano l'attività immunomodulatrice del PBDE-47 su linee cellulari primarie ed immortalizzate inducendo alterazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno, di pathways apoptotici e del rilascio di citochine pro-infiammatorie.

Volendo dunque indagare sugli effetti immunotossici di tali sostanze sono stati effettuati studi di citotossicità, quali LDH e MTS, e di genotossicità, tramite saggi Comet, sulla linea cellulare macrofagica THP-1 M0. I macrofagi sono una classe cellulare eterogenea e dinamica; eterogenea in quanto è possibile individuare più sottoclassi che si distinguono per fenotipo e funzione, dinamica in quanto il macrofago ha l'abilità di modificare il proprio stato di attivazione in risposta a fattori di crescita, prodotti microbici, derivati nucleotidici, glucocorticoidi e altri modulatori presenti nel microambiente che lo circonda e "polarizzare" in uno stato fenotipico piuttosto che un altro (Sahebkar, (2018)). I macrofagi costituiscono la prima linea di difesa nelle infezioni batteriche e virali e svolgono un ruolo primario nella risposta immunitaria. Svolgono funzioni multiple: 1) fagocitano patogeni, cellule infette o morenti; 2) presentano antigene associato a molecole MHC ai linfociti T nei linfonodi, diventando principale punto di connessione tra sistema immunitario innato e acquisito; 3) producono differenti tipi di citochine tramite le quali possono attivare/amplificare la risposta immune e regolare le altre cellule dell'immunità; 4) promuovono il rimodellamento tissutale (Murphy K.).

PROTOCOLLO DIFFERENZIAMENTO LINEA CELLULARE MONOCITARIA THP-1 IN LINEA CELLULARE MACROFAGICA THP-1 M0

I saggi di citotossicità e genotossicità sono stati condotti sulla linea cellulare umana monocitaria immortalizzata THP-1 (ECACC 88081201), oggi ampiamente utilizzata per comprendere i meccanismi di funzionamento di monociti e macrofagi. Di particolare interesse è l'utilizzo di questa linea cellulare per comprendere patologie associate al sistema immunitario. Le cellule THP-1 in commercio derivano dal sangue di pazienti affetti da leucemia monocitica acuta. È possibile indurre differenziamento delle cellule THP-1 da fenotipo monocitario a fenotipo macrofagico attraverso l'utilizzo di forbolo-12-miristato-13-acetato (PMA, *Sigma-Aldrich*). Il differenziamento monocita/macrofago è stato indotto seguendo il seguente protocollo: le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C e 5% di CO₂ nel terreno RPMI 1640 (*Gibco, Life Technologies*) supplementato con 10% di FBS (Siero Fetale Bovino, *Gibco, Life Technologies*) inattivato al calore e 1% di antibiotici (Penicillina 5,000 U/ml e Streptomicina 5,000 µg/ml, *Gibco, Life Technologies*). Le cellule THP-1, in forma monocitaria, sono state differenziate in macrofagi M0 mediante trattamento con 200 nM PMA per 72 ore a 37°C e 5% CO₂.

SAGGI DI CITOTOSSICITÀ

2.1. Saggio LDH

Il saggio LDH (Lattico deidrogenasi) è stato eseguito utilizzando il *Cytotoxicity Detection Kit plus* (*Roche Diagnostics GmbH, Germany*) e seguendo il protocollo della ditta fornitrice. Questo saggio colorimetrico consente di valutare gli effetti citotossici di alcune sostanze sulle cellule, misurando l'attività dell'enzima LDH rilasciato dalle cellule danneggiate, che pertanto viene utilizzato come indicatore di danno cellulare o tissutale. L'enzima LDH si trova nel citoplasma della maggior parte delle cellule dell'organismo, catalizza la conversione del lattato in acido piruvico, riducendo il NAD⁺ in NADH, che riduce a sua volta il tetrazolio in formazano; quest'ultimo determina lo sviluppo di una colorazione rosso-arancio, la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di LDH rilasciato dalle cellule danneggiate. Dunque maggiore è la quantità di enzima LDH rilasciato dal citoplasma della cellula, maggiore è la quantità di formazano presente e maggiore sarà il danno cellulare.

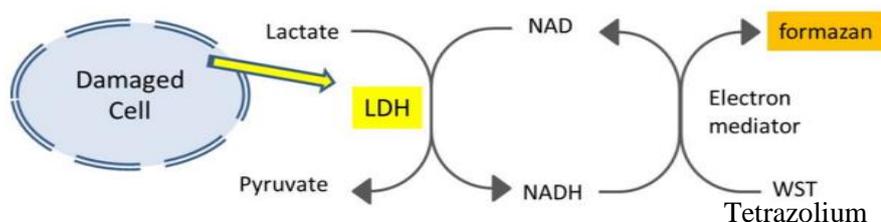


Figura 1. Saggio LDH. Schematizzazione del principio di reazione.

Per questo saggio le cellule THP-1 M0 sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml in piastre da 96 pozzetti e trattate con le concentrazioni di PBDE-47 e rispettivo DMSO, riportate in Tabella 1, per 24 e 48 ore.

Tabella 1

DMSO	PBDE-47
0,1%	25 μM
0,05%	12.5 μM
0,025 %	6 μM
0,0125%	3 μM

In ogni esperimento sono stati inclusi 3 controlli:

1) *Background control (Bianco)*: viene determinata l'attività di LDH in 100 μ l di terreno di coltura (RPMI completo) privo di cellule.

2) *Low control*: viene determinato il rilascio dell'enzima LDH nel sovrinatante (100 μ l) di THP-1 M0 non trattate con PBDE-47

3) *High control*: viene determinato il massimo rilascio di LDH nel sovrinatante di THP-1 M0 trattate con 5 µl di soluzione di lisi contenente 1% Triton X-100 (soluzione di lisi).

Ogni esperimento, comprensivo dei relativi controlli, è stato condotto in triplicato.

Dopo il trattamento con il PBDE-47 per 24 e 48 ore sono stati aggiunti ai campioni *High control* 5 µl/pozzetto di soluzione di lisi.

La piastra è stata incubata per 15 minuti a 37°C e 5% CO₂. Successivamente, da ogni campione, sono stati prelevati 100 µl di sovrinatante e trasferiti in una nuova piastra e ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di Working Solution (preparata per 100 test, aggiungendo 250 µl catalizzatore a 11,25 ml di soluzione di colorazione). La piastra è stata quindi incubata al buio per 15 minuti a temperatura ambiente e successivamente le reazioni sono state bloccate aggiungendo 50 µl di Stop Solution ad ogni pozzetto. La concentrazione di LDH è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica delle piastre (*Glomax System, Discover and Explorer Detection Systems, Promega*) alla lunghezza d'onda di 490 nm. La percentuale di citotossicità è stata determinata mediante la seguente equazione:

$$\text{Percentuale di Citotossicità} = \frac{\text{O.D. Campione} - \text{O.D. Low control}}{\text{O.D. High control} - \text{O.D. Low Control}} \times 100$$

I dati mostrano che solo la concentrazione più alta di PBDE-47 (25 µM), a 48 ore di trattamento, induce un incremento di lisi cellulare pari al 5% (Figura 2).

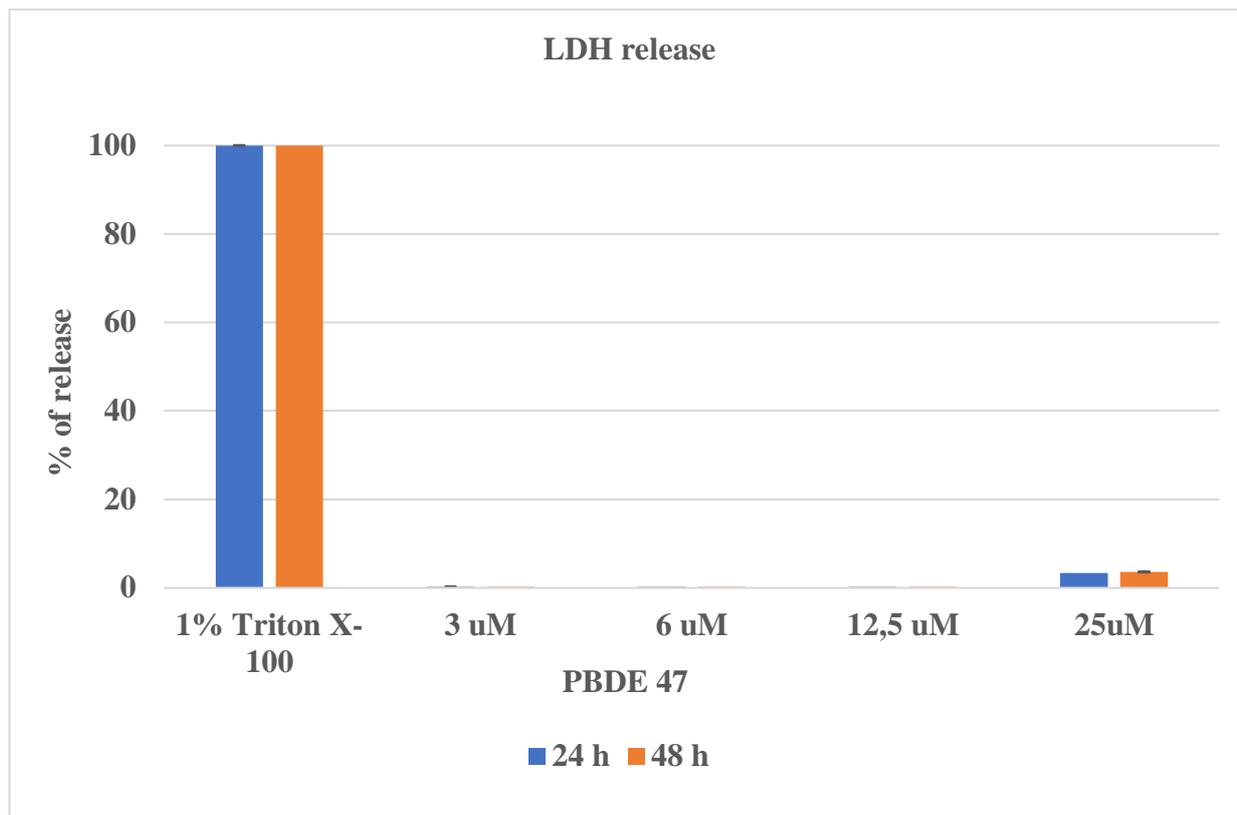


Figura 2. Saggi LDH. Percentuale di rilascio di lattato deidrogenasi da parte delle cellule THP-1 M0 trattate con concentrazioni crescenti di PBDE-47 per 24 e 48 ore. Come controllo positivo del saggio è stato utilizzato il buffer di lisi contenente il detergente Triton X-100. I dati mostrano la media di tre esperimenti \pm la deviazione standard.

2.2. Saggio MTS

La vitalità cellulare è stata saggiata anche mediante saggi MTS. Il saggio MTS (*OWEN'S Reagent*)[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, innersalt; MTS] è stato eseguito utilizzando il *Cell Titer96® Aqueous One Solution Proliferation Assay Kit* della *Promega (Madison, WI, USA)*. Questo saggio colorimetrico viene utilizzato per determinare il numero di cellule vitali mediante la presenza del componente tetrazolico MTS e di un reagente per l'accoppiamento elettronico (PES). Il composto MTS viene bioridotto dal NADPH o NADH mitocondriale delle cellule vitali in formazano, di colore viola, solubile nel mezzo di coltura; l'intensità della colorazione viola sviluppata è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.

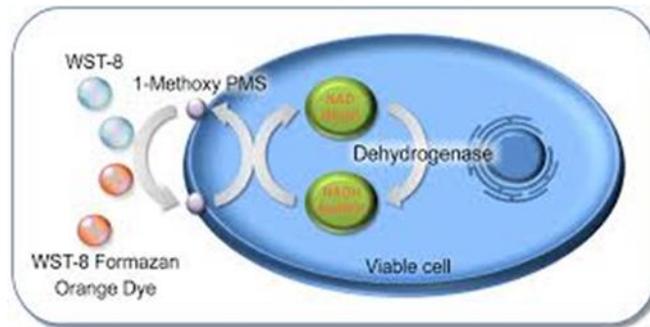


Figura 3 Saggio MTS. Schematizzazione del principio di reazione.

Al fine di svolgere i saggi MTS, le cellule THP-1 M0 sono state seminate alla concentrazione di 3.5×10^5 cellule/ml in piastre da 96 pozzetti e trattate con le stesse concentrazioni di PBDE-47 e DMSO utilizzate per i saggi LDH (tabella 1) e incubate per 24 e 48 ore. Seguendo il protocollo della ditta fornitrice, ad ogni campione (contenente 100 μ l di terreno) sono stati aggiunti 20 μ l di MTS e le cellule sono state successivamente incubate per circa 2 ore a 37°C al 5% di CO₂. Le letture spettrofotometriche sono state effettuate mediante un lettore per piastra automatizzato (*ImarkPlate Reader- BioRad*) alla lunghezza d'onda di 490 nm. La vitalità cellulare è stata determinata mediante la formula:

$$\text{Percentuale di vitalità} = \frac{\text{O.D. Trattato}}{\text{O.D. Non trattato}} \times 100$$

I dati riportati in figura 4 evidenziano che le concentrazioni più basse di PBDE-47 non interferiscono con la funzionalità mitocondriale, mentre le concentrazioni più alte del ritardante di fiamma riducono la vitalità cellulare del 5% e del 10% rispettivamente dopo 24 o 48 ore di incubazione.

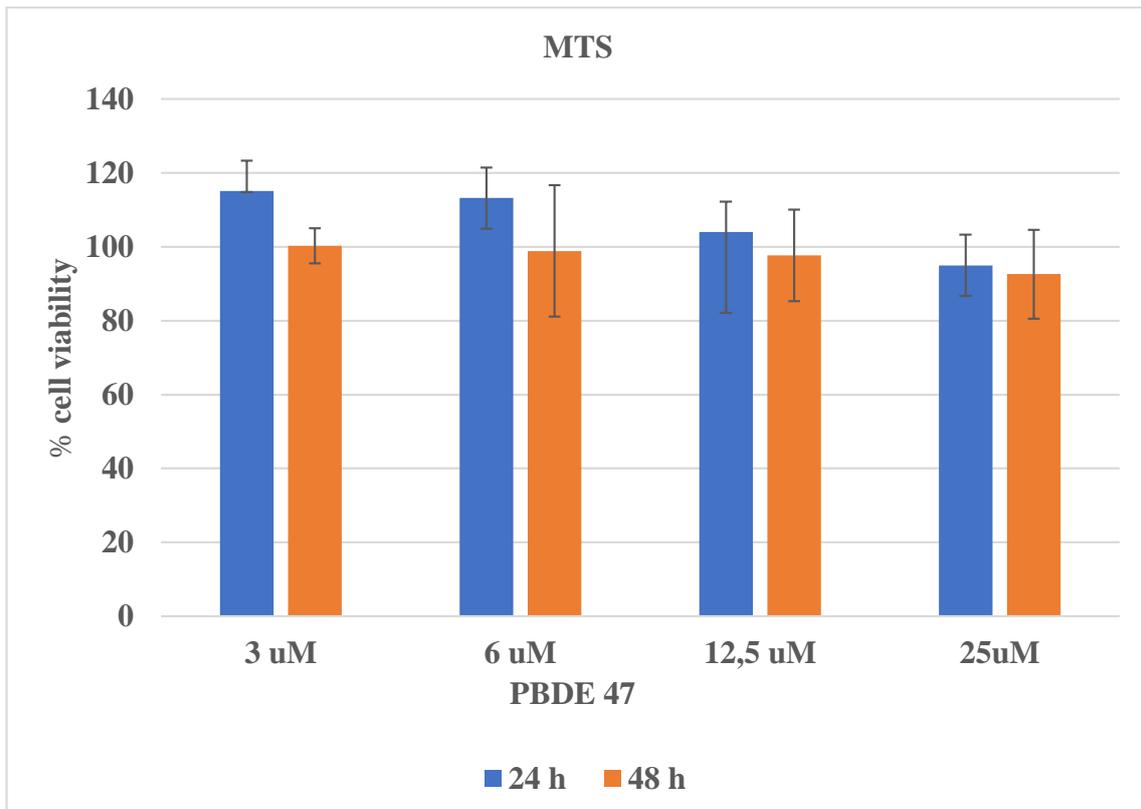


Figura 4. Saggi MTS. Percentuale di vitalità cellulare ottenuta dalla linea cellulare THP-1 differenziata in macrofago M0 e trattata con concentrazioni crescenti di PBDE-47. I dati ottenuti sono la media di tre esperimenti diversi \pm la deviazione standard.

I dati, presentati come la percentuale dei valori sperimentali, sono stati normalizzati tutti rispetto alle concentrazioni di DMSO, considerato il controllo degli esperimenti. Nessun effetto citotossico è stato trovato per tutte le concentrazioni di DMSO controllo (dallo 0,01% allo 0,1%) utilizzate nei saggi con il PBDE-47 (dati non mostrati).

ANALISI GENOTOSSICA

3.1. Saggio Comet

Il saggio Comet o saggio di elettroforesi su gel a singola cellula (SCGE), è una tecnica comunemente utilizzata per misurare il danno al DNA all'interno delle singole cellule. Il DNA cellulare danneggiato, contenente filamenti frammentati, viene separato dal DNA integro, mediante l'azione di un campo elettroforetico. Il campo elettrico determina infatti la migrazione del DNA frammentato e al microscopio si potrà osservare, a livello delle singole cellule che hanno subito il danno al DNA, una caratteristica forma a coda di "cometa". L'entità del danno al DNA può essere stimata visivamente, ma è più opportuno l'utilizzo di un appropriato software, che consente non solo la conta delle cellule che presentano la cometa, ma anche i parametri della coda stessa. Nei test di genotossicità le cellule THP-1 M0 sono state seminate alla concentrazione di 5×10^5 cellule/ml in piastre da 6 pozzetti e sono state trattate con concentrazioni differenti di PBDE-47 (3 μ M, 6 μ M, 12 μ M e 25 μ M) e DMSO (da 0,0125 % a 0,1 %); le piastre sono state incubate per 24 h a 37°C e 5% CO₂. Dopo l'incubazione le cellule sono state tripsinizzate (15 minuti a 37 °C), lavate due volte con 1X PBS freddo, pH 7,4 senza Ca²⁺ e Mg²⁺ (*Gibco*), contate e diluite fino a 10⁵ cellule/ml. Per effettuare il saggio di genotossicità è stato utilizzato il kit "*OxiSelect™ Comet Assay Kit (3-Well Slides)*" (*Cell Biolabs Inc.*). Prima di effettuare il saggio occorre preparare le seguenti soluzioni:

a. 1X Lysis Buffer (100 ml)

Pesare 14,6 g di NaCl; aggiungere 20 ml di 500 mM EDTA, 10 ml di 10X Lysis Solution e porre sull'agitatore magnetico fino a quando tutto il NaCl si sarà sciolto. Portare il volume a circa 90 ml con H₂O e aggiungere NaOH 10N fino a quando la soluzione raggiunge pH10. Portare il volume finale a 100 ml. Portare la temperatura della soluzione a 4°C prima dell'uso.

b. Alkaline Solution (100 ml)

Sciogliere 1.2 g di NaOH in 90 ml di H₂O, aggiungere 0,2 ml di soluzione di 500mM EDTA e portare in fine il volume a 100 ml. Portare la temperatura della Alkaline solution a 4°C prima dell'uso.

c. Alkaline Electrophoresis Solution (300 mM NaOH, pH >13, 1 mM EDTA)

Sciogliere 12.0 g di NaOH in 800 ml di H₂O; aggiungere 2.0 ml di soluzione EDTA 500 mM e portare il volume finale a 1L. Portare la temperatura della soluzione 4°C prima dell'uso.

d. 1X Vista Green DNA Dye

Diluire il Vista Green DNA Staining Solution 1:10000 in TE Buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA). La soluzione può essere conservata a 4°C per 3 settimane, al buio.

Procedimento

La bottiglia di OxiSelect™ Comet Agarose è stata riscaldata a 90-95°C in un bagnetto termostato fino a quando l'agarosio si è sciolto completamente. Successivamente la bottiglia è stata trasferita in un bagnetto termostato a 37°C e lasciata per 20 minuti a questa temperatura.

Un'aliquota di 10 µl è stata prelevata da ogni campione di cellule trattate e unita a 90 µl (diluizione 1:10) di OxiSelect™ Comet Agarose (alla temperatura di 37°C), quindi sono stati prelevati 75 µl da ogni miscela e trasferiti nei pozzetti presenti sui vetrini del kit (fig.5).

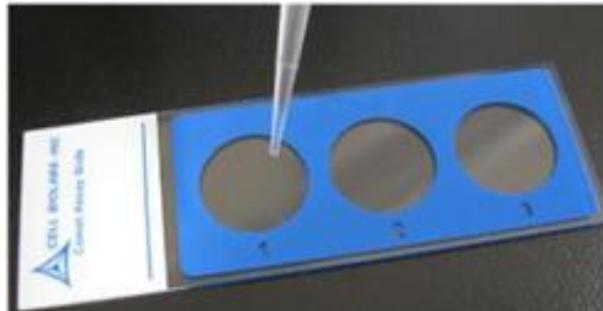


Figura 5. Saggio Comet: vetrino a 3 pozzetti: in ogni pozzetto vengono caricati 75 µl di miscela “campione + agarosio”. Immagine tratta da OxiSelect™ Comet Assay Kit (3-Well Slides)” (Cell Biolabs Inc.)

I vetrini sono stati mantenuti in posizione orizzontale e successivamente incubati per 15 minuti a 4 °C al buio. I vetrini sono stati quindi immersi con molta attenzione in Lysis Buffer a pH 10 pre-raffreddato e incubati per 45 minuti sempre a 4 °C. I vetrini sono stati trasferiti in soluzione alcalina

fredda e incubati per 30 minuti a 4 °C al buio. Dopo l'incubazione, è stata avviata l'elettroforesi orizzontale, a 300 mA per 30 minuti in Buffer Elettroforetico Alcalino (Fig.6).

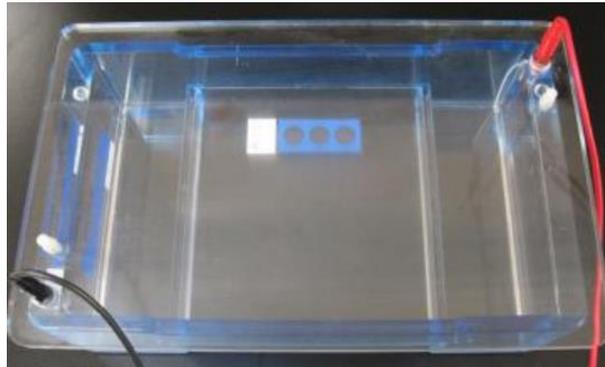


Figura 6. Elettroforesi orizzontale. Immagine tratta da OxiSelect™ Comet Assay Kit (3-Well Slides) (Cell Biolabs Inc).

I vetrini sono stati lavati due volte in H₂O distillata a 4°C per 2 minuti e incubati per 5 minuti in Etanolo 70%. L'etanolo è stato quindi rimosso e i vetrini lasciati asciugare per circa 5 minuti. Una volta asciutti, sono stati aggiunti ai vetrini 100 µL per pozzetto di 1X Vista Green DNA Dye e i vetrini incubati a temperatura ambiente per 15 minuti al buio. Infine i campioni sono stati osservati al microscopio a fluorescenza usando il filtro FITC. L'ingrandimento al microscopio è stato settato a 5X, l'immagine è stata acquisita e analizzata con *Comet Assay IV program* (Perceptive Instruments, Instem, UK). L'analisi statistica di tre differenti esperimenti indica che non ci sono significative differenze tra i controlli (DMSO 0,1%) e i campioni trattati con PBDE-47 alle concentrazioni 3, 6, 12 µM; invece, una significativa differenza è stata osservata tra cellule trattate con PBDE-47 25 µM e cellule controllo, indicando la genotossicità di tale concentrazione di PBDE-47 (Fig. 7).

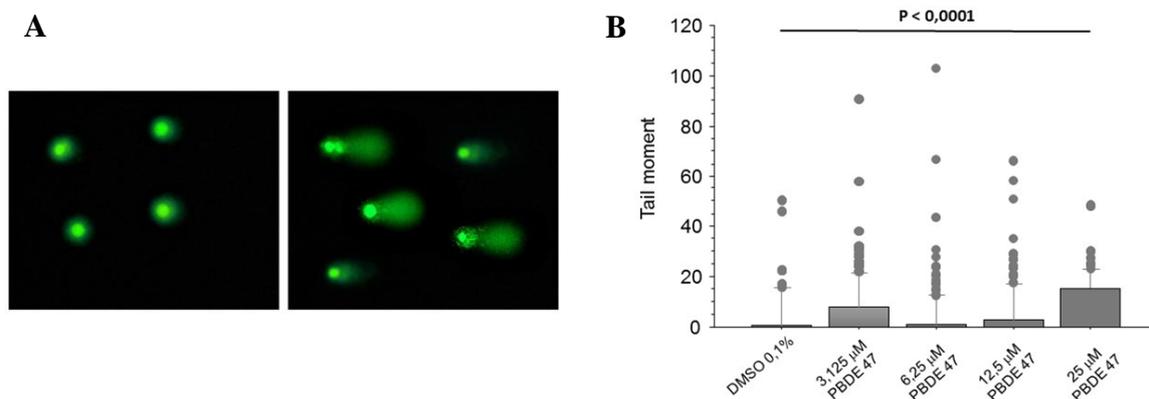


Figura 7. Saggio Comet. A. Immagine tratta da OxiSelect™ Comet Assay Kit (3-Well Slides) dove si evince la caratteristica forma a cometa delle cellule che hanno subito danno al DNA (Cell Biolabs Inc). B. Analisi statistica dei dati di genotossicità ottenuti dal trattamento delle THP-1 M0 con concentrazioni crescenti di PBDE-47 (Kruskal-Wallis test ($p < 0.0001$))

Bibliografia

Longo V, L. A. (2018, Dec 11). In vitro exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) impairs innate inflammatory response. *Chemosphere* 219, p. 845-854.

Murphy K., T. P. (s.d.). *Janeway's Immunobiologia VII ed. Piccin.*

Sahebkar, A. S.-M.-A. ((2018)). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. . *Journal of Cellular Physiology*, 6425-6440.

“OxiSelect™ Comet Assay Kit (3-Well Slides)” (Cell Biolabs Inc.)