

# INDICE

<b>1 Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1 L'inflammazione	1
1.1.1 Meccanismi dell'inflammazione	1
1.1.1.1 Attivazione di PRR	1
1.1.1.2 Le citochine	2
1.1.1.3 TNF- $\alpha$	3
1.1.1.4 IL-1 $\beta$	3
1.1.1.5 IL-6	3
1.1.1.6 TGF- $\beta$	3
1.1.1.7 IL-10	4
1.2 Il sistema immunitario ed i macrofagi	4
1.2.1 Emopoiesi e cellule del sistema immunitario	6
1.2.2 Memoria immunologica dei macrofagi e cell learning	7
1.3 Macrofagi	8
1.3.1 Origine dei macrofagi	8
1.3.2 Il meccanismo d'azione dei macrofagi	10
1.3.3 Polarizzazione dei macrofagi	10
1.3.4 Transizione tra fenotipi M1 ed M2	12
<b>2 Scopo della tesi</b>	<b>14</b>
<b>3 Materiali e metodi</b>	<b>15</b>
3.1 Colture cellulari	15
3.2 Differenziamento delle THP-1	18
3.2.1 Differenziamento delle THP-1 in M0	18
3.2.2 Polarizzazione delle THP-1 in M1	18
3.2.3 Polarizzazione delle THP-1 in M2	19
3.3 Test del Micoplasma	19
3.3.1 PCR	21
3.3.2 Elettroforesi su gel di agarosio	22
3.4 Analisi dell'espressione dei marcatori di differenziamento tramite RT-PCR	23
3.4.1 Estrazione di RNA	24
3.4.2 Quantificazione dell'mRNA al NanoDrop	25
3.4.3 Retrotrascrizione con il kit TAKARA	26
3.4.4 Real time PCR	30
3.5 Analisi della citotossicità con saggio MTT	33
<b>4 Risultati</b>	<b>36</b>
4.1 Differenziamento di cellule Thp-1 in monociti M0	36
4.2 Polarizzazione di monociti M0 in M1	37
4.2.1 Valutazione della citotossicità di LPS e IFN- $\gamma$	38
4.2.2 LPS e IFN- $\gamma$ inducono la polarizzazione degli M0 in M1	39
4.3 Polarizzazione di monociti M0 in M2	43
<b>5 Discussione</b>	<b>46</b>
<b>Bibliografia e sitografia</b>	<b>49</b>

# **1 Introduzione**

## **1.1 L'inflammatione**

L'inflammatione è una risposta protettiva del sistema immunitario che si attiva in seguito all'esposizione a stimoli nocivi come agenti patogeni (batteri, virus, funghi), cellule danneggiate, composti tossici o radiazioni. Lo scopo principale è l'eliminazione del fattore scatenante e l'avvio della riparazione tissutale. Rappresenta dunque un meccanismo di difesa essenziale per mantenere l'omeostasi e garantire la salute dell'organismo, poiché consente di contenere e neutralizzare potenziali minacce, favorendo la guarigione e il ripristino della funzionalità dei tessuti coinvolti. Tuttavia, affinché l'inflammatione sia risolutiva, deve essere attentamente regolata: un'inflammatione acuta efficace dovrebbe essere transitoria e risolversi una volta che lo stimolo lesivo è stato eliminato. Se invece questo processo diventa cronico (settimane, mesi o anni), può comportare una risposta immunitaria eccessiva o prolungata, con conseguente danno ai tessuti sani e sviluppo di patologie croniche caratterizzate da un punto di vista istologico dall'infiltrazione di cellule mononucleate e da fibrosi (1)(2)(3).

### **1.1.1 Meccanismi dell'inflammatione**

Sebbene la risposta infiammatoria proceda in relazione alla natura dello stimolo iniziale e alla localizzazione nel corpo umano, tutte le risposte condividono un meccanismo comune riassumibile in quattro tappe principali (1):

- 1) Riconoscimento degli stimoli da parte dei PRR (Pattern Recognition Receptors)
- 2) Attivazione di pathways pro-infiammatori
- 3) Rilascio di marcatori pro- ed anti-infiammatori
- 4) Reclutamento di cellule immunitarie

#### **1.1.1.1 Attivazione di PRR**

Le cellule del sistema immunitario innato, tra cui macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili e cellule NK, attraverso i Pattern Recognition Receptors (PRR), riconoscono specifiche strutture molecolari, PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) e DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), presenti sulla superficie di patogeni, cellule apoptotiche e cellule danneggiate. I PAMPs, assenti nell'ospite, derivano dai microorganismi (batteri, virus, funghi e parassiti, come il LPS batterico), i DAMPs invece sono molecole endogene prodotte durante un danno cellulare o stress (4)(5).

Il riconoscimento dei PAMPs e DAMPs da parte dei PRR attiva risposte immunitarie anti-infezione, antitumorali e altri effetti protettivi aspecifici, tra cui vie di segnalazione intracellulari che attivano la risposta immunitaria. La maggior parte dei PRR nel sistema immunitario dell'essere umano può essere classificata nelle seguenti 5 classi in base alla struttura del dominio proteico (4)(6):

- Toll-like Receptors (TLR);
- Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs);
- Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs);
- C-type lectin receptors (CLRs);
- Absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors (ALRs)

### **1.1.1.2 Le citochine**

Le citochine sono una famiglia ampia e diversificata di piccole proteine o glicoproteine di basso peso molecolare, solitamente inferiori a 30 kDa. Svolgono un ruolo centrale nella immunomodulazione che regola la risposta infiammatoria, ma intervengono anche nelle differenziazioni cellulari e nella chemiotassi. I macrofagi sono sicuramente tra i principali produttori di citochine tra le cellule del sistema immunitario (7).

Gli effetti biologici indotti da una citochina si manifestano attraverso il legame ad alta affinità con il proprio recettore sulla superficie della cellula bersaglio. L'azione delle citochine e dunque il loro effetto può essere: autocrina, paracrina, oppure endocrina (8). L'attivazione del recettore avvia una serie di vie di segnalazione intracellulare, culminando in modificazioni dell'espressione genica della cellula bersaglio e portando a vari effetti biologici, tra cui differenziazione, proliferazione o attivazione della cellula. Le citochine presenti nell'ambiente extracellulare durante una risposta immunitaria possono interagire secondo diversi schemi: possono avere effetti pleiotropici (generando risposte diverse su vari tipi di cellule bersaglio), essere ridondanti (più citochine producono lo stesso effetto), agire in modo sinergico (potenziando reciprocamente la loro azione), avere un effetto antagonista (una citochina inibisce l'azione di un'altra) o funzionare attraverso una cascata di induzione (meccanismo a più stadi che amplifica la produzione di specifiche citochine). Queste interazioni consentono il reclutamento e l'attivazione coordinati di un'intera rete di cellule immunitarie, pur essendo iniziate da un numero limitato di citochine rilasciate da singole cellule. Alla famiglia delle citochine appartengono: le interleuchine (IL), gli interferoni (IFN), i fattori stimolanti le colonie (CSF), i fattori di necrosi tumorale (TNF), i fattori di crescita trasformanti  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e

le chemochine. Grazie alla loro funzione, le citochine possono essere diversificate in pro- e anti-infiammatorie, e la loro produzione da parte delle cellule può essere utilizzata come marker di stati pro- o anti- infiammatori (9)(10)(11).

#### **1.1.1.3 TNF- $\alpha$**

Il TNF (Fattore di Necrosi Tumorale) ha attività pro-infiammatoria e funge da principale induttore nei monociti, promuovendo l'espressione dei recettori toll-like TLR2 e TLR4, e facilitando la marginazione e la diapedesi cellulare nei siti infiammatori. È anche un potente attivatore dei neutrofili, influenzando adesione, chemiotassi, degranulazione e burst respiratorio. Quando viene prodotto in modo eccessivo, può provocare reazioni infiammatorie locali dannose per l'organismo o addirittura entrare in circolo e provocare complicanze sistemiche (12).

#### **1.1.1.4 IL-1 $\beta$**

L'interleuchina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) è una citochina codificata nel genoma umano dal gene IL1B situato sul cromosoma 2 (loc: 2q14.1) e fa parte della famiglia delle interleuchine 1. Viene prodotta dai macrofagi attivati come una pro-proteina, successivamente attivata da un taglio proteolitico mediato dalla caspasi 1 e trasformata in una citochina pro-infiammatoria, IL-1 $\beta$  è fondamentale nella risposta infiammatoria grazie al suo effetto in diverse funzioni cellulari, tra cui la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi (13).

#### **1.1.1.5 IL-6**

L'Interleuchina 6 (IL-6) è una citochina principalmente con attività pro-infiammatoria e codificata dal gene IL-6 (loc: 7p15.3). Viene secreta prevalentemente dai macrofagi, innescando la risposta della fase acuta; tuttavia, viene rilasciata anche da linfociti T e B, fibroblasti, cellule endoteliali, cheratinociti, epatociti e cellule del midollo osseo. Grazie all'IL-6 i linfociti B si differenziano in plasmacellule mature e secernono immunoglobuline, mentre nei linfociti T media l'attivazione, la crescita e la differenziazione cellulare. D'altra parte, IL-6 svolge anche un ruolo anti-infiammatorio grazie ai suoi effetti inibitori su TNF- $\alpha$  e IL-1 e alla sua attivazione di IL-1ra e IL-10 (14).

#### **1.1.1.6 TGF- $\beta$**

La superfamiglia del TGF- $\beta$  gioca un ruolo cruciale nella risoluzione dell'infiammazione, regolando numerosi processi biologici, inclusi crescita, sviluppo, omeostasi tissutale e modulazione del sistema immunitario. Esistono tre isoforme note di TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1,

TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3) nei mammiferi; queste condividono regioni altamente conservate, ma presentano differenze in alcune sequenze di amminoacidi, pur attivando le stesse vie di segnalazione. Il TGF- $\beta$ 1 è uno dei più potenti regolatori endogeni negativi dell'emopoiesi. Esso modula la proliferazione, la differenziazione e la funzionalità di vari tipi di cellule del sistema immunitario, inclusi linfociti, macrofagi e cellule dendritiche. Il TGF- $\beta$  è coinvolto nella normale maturazione e differenziazione delle cellule B e T mentre nelle cellule mieloidi, come macrofagi e monociti, è per lo più soppressivo. Esso inibisce la proliferazione cellulare e regola la produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, tuttavia, è in grado di potenziare alcune altre attività delle cellule mieloidi (15).

#### **1.1.1.7 IL-10**

L'Interleuchina-10 (IL-10) ha attività anti-infiammatoria ed è la citochina cardine della famiglia IL-10, che comprende anche le citochine IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26. Il legame di IL-10 con il suo recettore eterotetrameric, composto da IL-10RA e IL-10RB, attiva la fosforilazione di STAT3 tramite JAK1 e STAT2. Successivamente, STAT3 trasloca nel nucleo, dove regola l'espressione di mediatori antinfiammatori. L'IL-10 agisce in particolare sulle cellule presentanti l'antigene (APC) inibendone il rilascio di citochine pro-infiammatorie, tra cui, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Inoltre, interferisce con la presentazione dell'antigene riducendo l'espressione delle molecole MHC di classe II e delle molecole costimolatorie, limitando l'attivazione delle cellule T. Infine regola la risposta infiammatoria dei macrofagi riprogrammando vie metaboliche essenziali, tra cui la segnalazione mTOR (16)(17).

## **1.2 Il sistema immunitario ed i macrofagi**

Il sistema immunitario è un insieme articolato di organi, tessuti, cellule, sostanze chimiche e processi la cui funzione principale è preservare l'organismo, tanto da agenti esterni quali microorganismi o tossine, quanto da danni interni come cellule tumorali o danneggiate (18)(19).

Il concetto di immunità risale a tempi molto antichi, ma è soprattutto dopo il XVIII secolo, grazie al contributo di grandi pionieri dell'immunologia come Jenner, Pasteur, Koch, Metchnikoff, Landsteiner, Ehrlich e Behring se nel tempo si è resa possibile la comprensione dei sofisticati processi cellulari e molecolari alla base del sistema immunitario (20). In particolare, Metchnikoff comprese l'esistenza di cellule ad attività fagocitaria, tra cui i macrofagi che, inglobano e distruggono materiale nocivo, gettando

così le basi dell'immunità innata. Behring ed Ehrlich invece mossero i primi passi nell'immunità acquisita, identificando anticorpi capaci di neutralizzare alcune tossine microbiche, che vennero poi considerati nell'ambito della stessa immunità acquisita come appartenenti alla componente umorale e distinti da quella cellulo-mediata (21).

Il sistema immunitario, dunque, vede l'integrazione di queste due distinte linee di difesa: immunità innata e immunità adattativa. L'immunità innata rappresenta la prima forma immediata di difesa non specifica nei confronti di un danno e si attiva immediatamente o entro poche ore dall'incontro con un determinato antigene. Questa prima linea difensiva si basa su quattro componenti chiave: le prime sono le barriere anatomiche, come pelle, muco e ciglia, che ostacolano l'ingresso e la proliferazione dei microbi o, nel caso delle ciglia, aiutano ad espellere i patogeni già penetrati. La seconda comprende le barriere fisiologiche, tra cui la regolazione della temperatura corporea, variazioni del pH (ad esempio, l'ambiente acido dello stomaco con azione antimicrobica) e mediatori chimici, come il lisozima antibatterico, gli interferoni antivirali e le proteine del complemento. Il terzo tipo è rappresentato dalla risposta infiammatoria: a seguito dell'ingresso di un microorganismo patogeno o ad un danno, si osserva localmente la formazione di un essudato che contiene proteine plasmatiche e leucociti, tra cui anche monociti, che nel tessuto differenzieranno in macrofagi. Oltre ai monociti/macrofagi, nei tessuti sono presenti le cellule dendritiche che avranno poi il compito di presentare gli antigeni ai linfociti T, ed i neutrofili che arrivano nel tessuto durante l'infiammazione; questi ultimi una volta fagocitati e uccisi i patogeni, muoiono (22). L'immunità adattativa, a differenza di quella innata, è molto specifica e specializzata e le sue cellule, nonostante abbiano bisogno di un tempo maggiore per attivarsi (qualche giorno) e svolgere le loro funzioni effettrici di eliminazione dell'antigene, immunizzano l'organismo ad incontri successivi con lo stesso antigene/patogeno grazie alla loro memoria immunologica. Questa permette all'organismo di rispondere in modo più rapido ed efficace ad un futuro incontro con lo stesso patogeno. Oltre la specificità e la memoria, l'altra importante caratteristica dell'immunità adattativa è la tolleranza, ovvero la capacità di non reagire contro il "self". Le due forme di immunità, innata e adattativa, sono dipendenti l'una dall'altra e perfettamente integrate, tanto che, eventuali difetti in una delle due possono essere causa di immunodeficienze o patologie autoimmuni (23)(24).

## 1.2.1 Emopoiesi e cellule del sistema immunitario

Le cellule del sistema immunitario, così come gli eritrociti e le piastrine, originano dal midollo osseo a partire da una cellula staminale pluripotente ematopoietica (HSC) (Figura 1) (25). Da questa cellula si originano la linea mieloide e quella linfoide. I linfociti (B e T), le cellule natural killer (NK) e alcune cellule dendritiche derivano da un precursore linfoide comune. D'altra parte, gli eritrociti, le piastrine, i granulociti (basofili, eosinofili e neutrofili) e i monociti, che sono precursori dei macrofagi, si originano da un progenitore mieloide comune (CD33+) (26). Il processo di emopoiesi è regolato da vari fattori, tra cui eritropoietina (EPO) e trombopoietina (TPO), citochine come IL-3 ed IL-11, GM-CSF (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor), M-CSF (monocyte-macrophage colony-stimulating factor) e G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) (27).

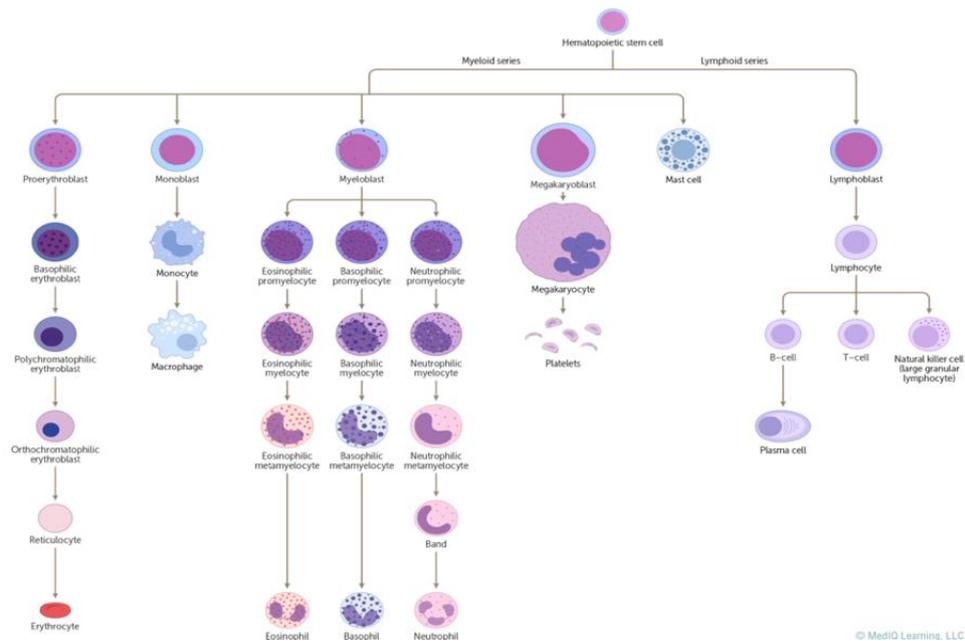


Figura 1 - Rappresentazione grafica dell'emopoiesi

Le cellule dell'immunità innata e adattativa collaborano nel processo immunitario. Quelle del sistema immunitario innato sono specializzate nella fagocitosi, mentre le cellule dell'immunità adattativa si distinguono per la loro memoria immunitaria. Tra le cellule dell'immunità innata, mastociti e basofili sono coinvolti nell'attivazione della risposta infiammatoria acuta, gli eosinofili sono responsabili della degradazione di parassiti troppo grandi per essere fagocitati, mentre neutrofili e macrofagi fagocitano i patogeni. A differenza dei neutrofili, che hanno una vita breve di circa 5-6 giorni, i macrofagi possono vivere nei tessuti per mesi o anni. Le cellule natural killer (NK) inducono

l'apoptosi di cellule tumorali o infette da virus. Inoltre, secernono interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ), essenziale per l'immunità antivirale e l'attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APC). Le cellule dendritiche agiscono come fagociti, ma la loro funzione principale è quella di APC per attivare la risposta immunitaria adattativa, collegando così l'immunità aspecifica a quella specifica. Nei linfonodi avviene il riconoscimento dell'antigene in seguito al quale avviene l'espansione clonale dei linfociti specifici. I CD8+ (citotossici) avranno funzioni effettrici citotossiche (rilasciano sostanze pro-apoptotiche), I CD4+ (T helper) regolano e potenziano la risposta immunitaria, rilasciando citochine che indirizzano altre cellule immunitarie. In particolare, la sottoclasse Th1 produce IFN- $\gamma$  favorendo l'attivazione dei macrofagi. I linfociti B maturano nel midollo osseo e vengono rilasciati nel circolo sanguigno una volta formati. Nei linfonodi si attivano a seguito del riconoscimento degli antigeni non self e vanno incontro ad espansione clonale, per poi differenziarsi in plasmacellule secernenti anticorpi o in cellule B della memoria in grado di persistere a lungo (28)(26).

### **1.2.2 Memoria immunologica dei macrofagi e cell learning**

Studi recenti hanno sfidato la concezione tradizionale della memoria immunologica, considerata una prerogativa esclusiva dell'immunità adattativa. È stato proposto che anche le cellule dell'immunità innata, come i macrofagi e la microglia, oltre alle loro funzioni di fagocitosi, presentazione dell'antigene, infiammazione e successivamente riparazione del danno, possano sviluppare una propria forma di memoria immunologica (29).

Le nuove teorie sulla memoria macrofagica considerano l'esistenza di due forme differenti di memoria: l'immunità addestrata (Trained Immunity) e l'immunità conferita (Endowed Immunity). L'immunità addestrata implica un cambiamento funzionale e metabolico dei macrofagi stessi, che a seguito dell'interazione con specifici stimoli, tra cui le citochine, subiscono una riprogrammazione epigenetica e metabolica la quale addestra i macrofagi a rispondere in modo più rapido ed efficace a infezioni successive. Al contrario, il concetto di immunità conferita, scoperto più recentemente, si riferisce alla capacità delle cellule dell'immunità innata, come i macrofagi, di possedere una sorta di "memoria" simile a quella linfocitaria, suggerendo che le cellule innate siano dotate fin dall'inizio di capacità potenziate, ovvero una sorta di "predisposizione" immunitaria (30)(31).

Nell'ambito della "trained immunity", il concetto di cell learning si riferisce alla capacità di cellule dell'immunità innata di apprendere e di modificare il proprio comportamento in base a stimoli precedenti. In particolare, è stato dimostrato come i macrofagi siano capaci della forma più semplice di apprendimento, ovvero l'apprendimento non associativo, composto di adattamento e sensibilizzazione. D'altro canto, vi sono ancora pochi studi che indagano un livello più alto di apprendimento quale l'apprendimento associativo, che prevede la capacità di associare stimoli tra loro o di associare ad un particolare stimolo uno specifico comportamento, come avviene nel condizionamento classico (due stimoli associati) o nel condizionamento operante (comportamento e stimolo) (32)(33).

### **1.3 Macrofagi**

I macrofagi sono cellule mieloidi dell'immunità innata, posizionati strategicamente in tutti i tessuti dell'organismo, e presenti in tutti i vertebrati. Elias Metchnikoff, considerato il padre dell'immunologia cellulare, li definì per la prima volta "i grandi mangiatori". Fu il primo a notare la somiglianza tra la fagocitosi negli invertebrati e nelle cellule del sangue, grazie ad un'osservazione di microscopia su macrofagi in larve di stelle marine e in pulci d'acqua infette. È importante evidenziare che Metchnikoff riconobbe non solo il loro ruolo nella regolazione dello sviluppo e nel controllo dei patogeni, ma anche nella riparazione dei tessuti danneggiati, determinando l'importanza dei macrofagi nei processi infiammatori e di mantenimento dell'omeostasi tissutale (34). Al microscopio si osservano come cellule di grandi dimensioni, dalla forma variabile in funzione dello stato di attivazione. Hanno un citoplasma abbondante ricco di vescicole e di lisosomi, che riflettono la loro intensa attività fagocitica e metabolica. Il nucleo reniforme e spesso eccentrico può risultare schiumoso o contenere vacuoli. Sono cellule estremamente plastiche che modificano la loro morfologia in funzione della loro polarizzazione. Nonostante i macrofagi siano noti per la loro intensa attività fagocitaria, sono APC e come tali presentano antigeni ai linfociti T helper (35)(36).

#### **1.3.1 Origine dei macrofagi**

Una minor parte dei macrofagi dell'organismo si sviluppa precocemente durante l'embriogenesi, colonizzando gli organi in formazione e costituendo un sistema complesso e specializzato all'interno di ciascun tessuto. Questi macrofagi residenti nei tessuti (TRM) sono cellule a vita lunga e, come dimostrato da recenti studi (37), possono

autorigenerarsi. Questo processo, anche detto “Self Renew”, fa riferimento alla capacità di autorinnovarsi, mediante un processo di proliferazione, garantendo così il mantenimento della popolazione nel corso del tempo. Ciò permette ai macrofagi TRM di svolgere funzioni immunitarie e di omeostasi tissutale a lungo termine. Ai TRM si aggiungono, durante lo sviluppo postnatale, i monociti derivati dalle HSC (MoM, Macrofagi derivanti da monociti), che contribuiscono alla formazione della maggior parte dei macrofagi nei diversi tessuti e vengono richiamati nel sito interessato a circa 48 ore dal danno. Ciò crea uno scenario complesso in cui i macrofagi di origine fetale e quelli derivati da cellule staminali ematopoietiche coesistono e collaborano per garantire il corretto funzionamento dei tessuti, sia in condizioni di omeostasi che in risposta a infezioni e infiammazioni (Figura 2). Sebbene i TRM possano essere identificati tramite marcatori pan-macrofagici comuni (CD11b, F4/80, MERTK e CD64), ogni nicchia tissutale specifica induce un programma trascrizionale distintivo (38)(39).

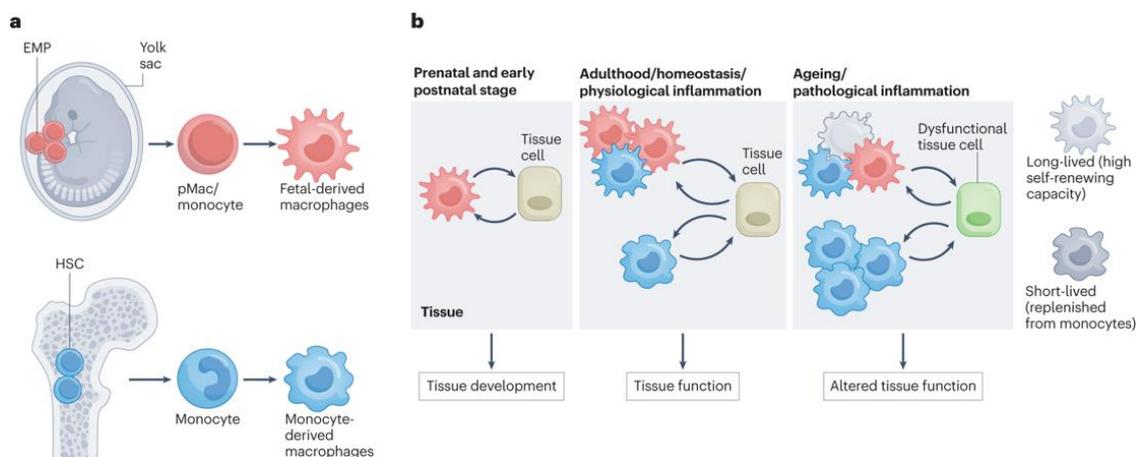


Figura 2 - Le due vie di sviluppo di macrofagi tissutali; modello animale di topo. a) I progenitori eritromieloidi (EMP) del sacco vitellino danno origine a pre-macrofagi (pMac) o monociti che si differenziano in macrofagi residenti nei tessuti (TRM). Al contrario, le cellule staminali ematopoietiche (HSC) possono dare origine a macrofagi a vita breve e a vita lunga durante la fase postnatale e adulta. b) I macrofagi derivati da EMP e HSC contribuiscono alla funzione del tessuto attraverso l'interazione reciproca e con cellule tissutali specializzate. Durante l'omeostasi, distinte sottopopolazioni di macrofagi interagiscono con le cellule dei tessuti per supportarne le funzioni. In seguito all'invecchiamento o all'infiammazione patologica, l'equilibrio preciso della distribuzione dei macrofagi nel tessuto viene disturbato innescando, ad esempio, l'apoptosi dei macrofagi a lunga vita o un aumento del reclutamento di macrofagi derivati dalle HSC a vita breve, portando così a una disfunzione dei tessuti.

I macrofagi MoM si sviluppano a partire da un progenitore CD34+ presente nel midollo osseo. Questo progenitore si differenzia progressivamente in monoblasti, poi in pro-monociti e infine in monociti (M0), che vengono rilasciati nel flusso sanguigno una volta maturi. I monociti rappresentano circa il 5-10% del totale dei leucociti umani circolanti (40). Dal punto di vista morfologico, queste cellule presentano una forma irregolare o

ovale, un nucleo a forma di rene, vescicole nel citoplasma e un alto rapporto nucleo/citoplasma. La loro permanenza nel sangue è piuttosto breve, con una durata massima di 1-2 giorni. Se non vengono reclutati nei tessuti per rispondere a stimoli di pericolo, i monociti muoiono e vengono eliminati dall'organismo (41).

### **1.3.2 Il meccanismo d'azione dei macrofagi**

I macrofagi rivestono un ruolo fondamentale come prima linea di difesa nel sistema immunitario. In situazioni di infezione, infiammazione o lesioni tissutali rispondono fagocitando agenti patogeni e detriti cellulari, e producendo agenti chemiotattici richiamano le altre cellule del sistema immunitario, tra cui altri monociti, che poi differenzieranno a loro volta, nei tessuti in macrofagi.

Quando i macrofagi riconoscono profili molecolari associati al patogeno (PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns) o di danno (DAMPs, Damage Associated Molecular Patterns) tramite i recettori di membrana, tra cui i Toll like (TLR), si attivano dei segnali di trasduzione intracellulari che avranno il compito di attivare vari fattori trascrizionali, tra cui NF- $\kappa$ B e JAK/STAT, che determineranno la produzione di citochine infiammatorie che verranno poi rilasciate nello spazio extracellulare. Tra queste citochine, sono incluse le pro-infiammatorie, come l'interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF $\alpha$ ), l'IL-6, l'IL-12 e le chemochine come la CXCL8 o IL-8. Mentre IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  causano, tra le altre cose, l'attivazione endoteliale, l'aumento della permeabilità vascolare e l'attivazione dei linfociti, IL-12 induce attivazione delle cellule natural killer (NK). L'attivazione dei TLR induce anche la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e delle specie reattive dell'azoto (RNS), molecole altamente reattive aventi un ruolo cruciale nell'eliminazione di agenti patogeni (42)(39).

### **1.3.3 Polarizzazione dei macrofagi**

I macrofagi possono assumere diversi fenotipi funzionali attraverso un processo noto come polarizzazione, che si osserva in risposta a vari segnali ambientali (prodotti microbici, cellule danneggiate, linfociti attivati) o a diverse condizioni fisiopatologiche. Questa polarizzazione è regolata da interazioni specifiche tra ligandi e recettori, che attivano distinti meccanismi di trasduzione del segnale e specifici pathways con il differenziamento in fenotipo M1 (attivato classicamente) e M2 (attivato alternativamente) (Figura 3)(43).

*Macrofagi M1.* Prodotti microbici o citochine pro-infiammatorie come l'interferone (IFN)- $\gamma$ , il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ) e i ligandi TLR stimolano il fenotipo M1. Il legame dell'IFN- $\gamma$  con il suo recettore specifico (IFNGR) attiva inizialmente le Janus chinasi (Jak), che a loro volta promuovono l'attivazione del trasduttore e attivatore della trascrizione 1 (STAT1). Questo processo stimola l'espressione genica di diverse molecole, tra cui il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II), l'interleuchina-12 (IL-12), la sintasi dell'ossido nitrico (NOS2) e il soppressore della segnalazione delle citochine (SOCS1). Un altro mediatore fondamentale nella polarizzazione M1 è il lipopolisaccaride (LPS), ligando del TLR4. Questo attiva due principali vie di segnalazione intracellulari: quella mediata da TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) e quella regolata da MyD88 (myeloid differentiation primary response 88). La via del TRIF porta all'attivazione di cascate di chinasi e culmina nell'attivazione del fattore di risposta all'interferone 3 (IRF3), stimolando la produzione di interferoni di tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ). Dall'altro lato, la via di MyD88 attiva il fattore nucleare kappa-B (NF-kB), coinvolgendo le subunità p65 e p50, e promuove anche la via dell'attivatore proteico 1 (AP-1) attraverso la famiglia delle MAPK.

Questi percorsi regolano l'espressione di numerosi geni infiammatori, tra cui citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12), chemochine (CXCL10, CXCL11), molecole costimolatorie e proteine coinvolte nel processamento degli antigeni (44).

*Macrofagi M2.* I macrofagi M2 sono associati a funzioni di resistenza ai parassiti, regolazione immunitaria e processi di riparazione, rimodellamento e omeostasi dei tessuti. Gli M2 vengono comunemente distinti in quattro sottotipi principali, M2a, M2b, M2c, M2d, dove ogni sottopopolazione è caratterizzata da specifici fattori di induzione, espressione di determinati recettori e produzione di proprie citochine. Secondo questa distinzione, gli M2 risultano essere una popolazione cellulare estremamente eterogenea. Studi più recenti propongono una plasticità maggiore delle cellule M2, la cui funzione è il mantenimento dell'omeostasi, facendo venir meno la distinzione tra i vari sottotipi.

Le citochine IL-4 e IL-13 sono le più caratterizzate nell'indurre il fenotipo M2. Generalmente, le vie intracellulari attivate dai loro recettori coinvolgono i segnali JAK1 e JAK3, e la traslocazione nucleare di STAT6 (responsabile della modulazione delle risposte immunitarie innate antivirali grazie al suo effetto sull'espressione dei geni dell'interferone) e altri fattori di trascrizione, quali IRF4 e PPAR $\gamma$  (peroxisome

proliferator-activated receptor  $\gamma$ ). Una varietà di proteine, come l'Arginasi 1 (Arg 1), Ym1 (o Chitinase 3-like 3, Chi3l3), Retn $\alpha$  (o Fizz1), CCL17 e CD206 (o recettore macrofagico del mannosio) sono controllati da STAT6, IRF4 e PPAR $\gamma$ .

L'attivazione dei macrofagi di tipo M2 porta all'espressione genica di mediatori e sostanze che svolgono funzioni essenziali per la risposta immunitaria e la riparazione dei tessuti, tra cui citochine (IL-10, TGF- $\beta$ ), Chemochine (CCL17, CCL22), PDGF, VEGF, CD206, CD163 (44)(45)(46).

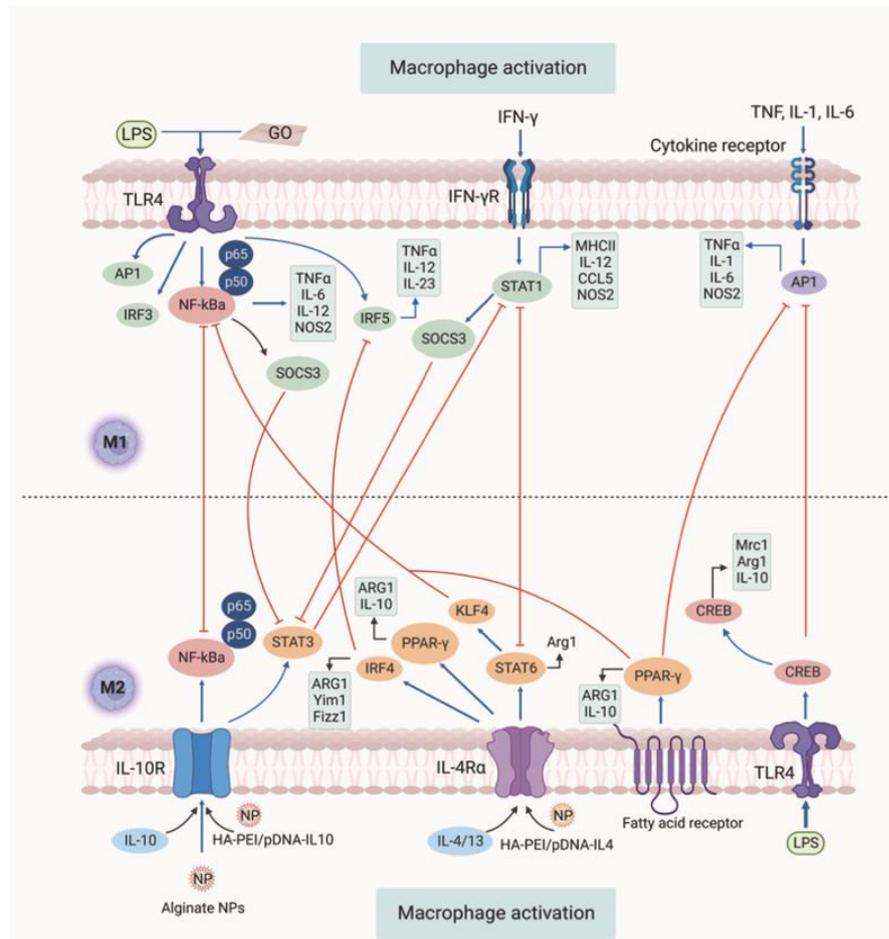


Figura 3 - Vie di segnalazione per la polarizzazione dei macrofagi. La figura illustra diverse strategie fondamentali per la polarizzazione dei macrofagi e mostra il controllo a feedback sulle vie di segnalazione di M1 e M2.

### 1.3.4 Transizione tra fenotipi M1 ed M2

Durante il decorso di una malattia, la transizione dei macrofagi tra diversi fenotipi può influenzare la risposta immunitaria in modo significativo. Se i macrofagi non passano correttamente dal fenotipo M1 pro-infiammatorio al fenotipo M2 anti-infiammatorio dopo la risoluzione dell'infezione, vi è il rischio di una sovrapproduzione di mediatori infiammatori, con conseguente danno tissutale e sviluppo di patologie infiammatorie croniche. Allo stesso modo, la transizione prematura da M1 a M2 durante l'infiammazione

può ridurre la capacità dei macrofagi di eliminare i patogeni e favorire reazioni immunitarie di tipo Th2, aumentando il rischio di allergie (46).

Il passaggio controllato da M1 a M2 dopo la risoluzione dell'infezione è essenziale per limitare l'infiammazione e promuovere la riparazione dei tessuti. D'altra parte, la transizione inversa da M2 a M1 può essere importante per intensificare le risposte antimicrobiche e prevenire eccessive reazioni Th2. Questo processo di scambio fenotipico, che avviene in modo graduale e dinamico, è conosciuto come plasticità dei macrofagi. In alcune situazioni, questa plasticità può assumere caratteristiche "paradossali", con i macrofagi che cambiano fenotipo in modo anomalo, ad esempio passando a M2 prima della risoluzione dell'infiammazione o tornando a M1 sotto stimoli tipici del fenotipo M2, compromettendo la corretta regolazione della risposta immunitaria (46)(47).

## 2 Scopo della tesi

I macrofagi sono una popolazione fenotipicamente e funzionalmente eterogenea di cellule derivanti dai monociti circolanti che, in funzione della distribuzione tissutale e degli stimoli ricevuti guidano processi pro- ed anti-infiammatori. In merito all'aspetto funzionale i macrofagi possono essere suddivisi in tre principali sottopopolazioni: macrofagi naïve, quiescenti (M0), pro-infiammatori (M1) e anti-infiammatori (M2). Gli M0 si attivano a seguito del riconoscimento di agenti patogeni e danni tissutali, hanno attività fagocitiche e subiscono rapidamente la polarizzazione verso il fenotipo M1 o M2 acquisendo il loro pannello completo di funzioni. Gli M1 sono ampiamente coinvolti nella risposta infiammatoria, durante la quale esercitano funzioni antimicrobiche ed antitumorali rilasciando citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6); gli M2 sono invece implicati nella fagocitosi dei detriti cellulari, nell'omeostasi dei tessuti a seguito di lesioni e nella risoluzione dell'infiammazione grazie al rilascio di citochine anti-infiammatorie quali TGF- $\beta$  e IL-10.

Nell'ambito di un progetto più ampio, volto a dimostrare l'ipotesi che anche i macrofagi possiedano una sorta di memoria immunologica, con meccanismi diversi rispetto a quelli chiaramente dimostrati per l'immunità adattativa, l'obiettivo di questo progetto di tesi è stato la definizione di un protocollo per l'allestimento dei modelli cellulari necessari a dimostrare la suddetta ipotesi, ed in particolare la polarizzazione, *in vitro*, dei tre fenotipi M0, M1 e M2, partendo dalla linea cellulare monocitica THP-1 derivante da leucemia mieloide acuta (AML), ampiamente usata in ambito di ricerca per lo studio dei macrofagi. A tal fine le THP-1 sono state sottoposte a trattamenti differenti e l'efficacia del protocollo e del differenziamento è stata valutata con tecniche di biologia molecolare e saggi di vitalità cellulare.

## **3 Materiali e metodi**

### **3.1 Colture cellulari**

Per il differenziamento dei macrofagi è stata utilizzata la linea cellulare monocitica THP-1 derivata da sangue periferico di paziente affetto da leucemia mieloide acuta (AML) e disponibile in commercio. Le cellule sono state acquistate da ATCC American Type Culture Collection e trasportate congelate. Le cellule della linea THP-1, essendo di origine tumorale, hanno capacità proliferativa indefinita e rappresentano dunque un modello cellulare, non solo più economico e gestibile rispetto alle colture primarie di monociti ottenuti da donatori, ma che garantisce anche un controllo delle condizioni sperimentali, una riproducibilità elevata e nessuna variabilità soggettiva. Per questo si caratterizzano per essere una linea di riferimento per studi di immunologia, tossicologia e di disordini del sistema immunitario.

Le cellule sono state coltivate, seguendo le indicazioni della ATCC, a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>, in fiasche T25 o T75 (Corning Costar, St. Louis MO, USA) in terreno RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute – Euroclone) supplementato con 10% FBS (Siero fetale bovino), 1% di Penicillina-Streptomicina e 1% di L-Glutammina. Le cellule sono state anche congelate per la loro conservazione in crio-vials in azoto liquido (-196°C) (48).

Il terreno RPMI 1640, sviluppato al Roswell Park Memorial Institute da Moore e dai suoi collaboratori nel 1966, contiene una serie di fattori utili a stimolare la proliferazione cellulare e per le sue caratteristiche viene oggi utilizzato per coltivare un ampio repertorio di cellule, tra cui monociti e linfociti B e T. Come tutti i terreni di coltura deve essere conservato in frigorifero a temperatura tra 2°C - 8°C.

Poiché le THP-1 crescono in sospensione, per essere coltivate e propagate devono essere regolarmente seminate in terreno fresco; ad ogni passaggio quindi le cellule vengono centrifugate e poi risospese e diluite in RPMI 1640 ad una concentrazione compresa nel range  $1-4 \times 10^5$  cells/ml ogni 3 giorni.

Nella tabella sottostante è indicata la composizione del terreno RPMI 1640 non addizionato con FBS, glutammina e antibiotici (49):

<b>Amino acids</b>		<b>Vitamins</b>	
Glycine	10 mg/l	Choline chloride	3 mg/l
L-Arginine	200 mg/l	D-Biotin	0.2 mg/l
L-Asparagine + H <sub>2</sub> O	50 mg/l	D-Ca pantothenate	0.25 mg/l
L-Aspartic acid	20 mg/l	Folic acid	1 mg/l
L-Cystine Dihydrochloride	65,2 mg/l	I-inositol	35 mg/l
L-Glutamic acid	20 mg/l	Nicotinamide	1 mg/l
L-Glutamine	300 mg/l	p-Aminobenzoic acid	1 mg/l
L-Histidine	15 mg/l	Pyridoxine+HCl	1 mg/l
L-Hydroxy-L-proline	20 mg/l	Riboflavin	0.2 mg/l
L-Isoleucine	50 mg/l	Thiamine+HCl	1 mg/l
L-Leucine	50 mg/l	Vitamine B12	0.005 mg/l
L-Lysine+HCl	40 mg/l	<b>Other components</b>	
L-Methionine	15 mg/l	D-Glucose	2000 mg/l
L-Phenylalanine	15 mg/l	L-Glutathione reduced	1 mg/l
L-Proline	20 mg/l	Phenol red	5,3 mg/l
L-Serine	30 mg/l	<b>Inorganic salts</b>	
L-Threonine	20 mg/l	Calcium Nitrate Tetrahydrate	100 mg/l
L-Tryptophan	5 mg/l	Magnesium sulfate anhydrous	48,8 mg/l
L-Tyrosine	128,8 mg/l	Potassium chloride	400 mg/l
L-Valine	20 mg/l	Sodium bicarbonate	2000 mg/l
		Sodium chloride	6000 mg/l

Tabella 1 - Costituenti del terreno RPMI 1640 w/ L-Glutamine

A questa soluzione di partenza, per coltivare le THP-1 vengono dunque aggiunti:

- ❖ FBS, ricco di fattori necessari per la sopravvivenza e la crescita cellulare, quali fattori di crescita, proteine e vitamine. Il FBS usato è stato acquistato dalla Gibco (Thermo Fisher Scientific) in confezioni da 500ml, sterile e filtrato a 0,1 µm. Prima del suo utilizzo il FBS viene “scomplementato” a 56°C, ovvero vengono

inattivati i fattori del sistema del complemento, suddiviso in aliquote da 50 ml e conservato a -20°C (50);

- ❖ Glutamina, che è un aminoacido essenziale, richiesto praticamente da tutte le cellule di mammiferi e insetti coltivate *in vitro*, poiché precursore nella sintesi di purine, pirimidine, amminozuccheri ed alcuni aminoacidi e principale fonte di energia per la proliferazione cellulare. Questo amminoacido non è stabile in soluzione e quindi deve essere aggiunto al terreno ogni volta che quest'ultimo viene preparato. Viene conservato in aliquote a -20°C (51);
- ❖ Gli antibiotici penicillina e streptomina, utilizzati nelle colture cellulari per prevenire la contaminazione batterica grazie alla loro efficace azione combinata contro i batteri gram-positivi e gram-negativi. La penicillina è stata purificata dal fungo *Penicillium notatum* ed agisce interferendo direttamente con il turnover della parete cellulare batterica e indirettamente innescando il rilascio di enzimi che alterano ulteriormente la parete stessa. La streptomina è stata originariamente purificata dallo *Streptomyces griseus* e agisce legandosi alla subunità 30S del ribosoma batterico, portando all'inibizione della sintesi proteica e alla morte dei batteri sensibili. Si usano ad una concentrazione dell'1% rispetto al totale del terreno e vengono conservati in aliquote pronte all'uso tra 5°C e -20°C (52);
- ❖ il 2-Mercaptoetanololo (ME), anche noto come  $\beta$ -ME, è un potente agente in grado di ridurre i ponti disolfuro (-S-S-) nelle proteine, responsabili spesso della aggregazione di cellule, e di mantenere i gruppi tiolici (-SH) in uno stato ridotto. Viene usato nei terreni di coltura per prevenire i livelli tossici dei radicali dell'ossigeno ed in cellule come le Thp-1, che tendono ad aggregarsi in gruppi cellulari, contribuisce al mantenimento delle cellule in sospensione prevenendo la formazione di tali aggregati. Non è un composto stabile in soluzione, perciò molti protocolli richiedono un'aggiunta al momento dell'utilizzo. Viene conservato in frigorifero a 2°C - 8°C ed utilizzato a temperatura ambiente, aggiungendone in proporzione 1  $\mu$ l/ml di terreno (53).

## 3.2 Differenziamento delle THP-1

### 3.2.1 Differenziamento delle THP-1 in M0

Per indurre la differenziazione delle cellule in monociti M0 le THP-1 sono state trattate con la PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, figura 4). Questo composto organico esterificato del forbolo è un potente attivatore della proteina chinasi C (PKC), appartenente ad una famiglia di secondi messaggeri coinvolti in diverse vie di segnalazione intracellulare (54). La soluzione madre 1 mg/ml, sospesa in DMSO (DiMetilSolfossido) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), viene diluita ad una soluzione intermedia di 10 ug/ml in terreno RPMI 1640, e quindi utilizzata per indurre il differenziamento. In linea con studi presenti in letteratura (55)(56)(57), le concentrazioni finali di PMA testate per indurre il differenziamento in M0 sono state PMA 10- 50- 100 ng/ml, ed il tempo di incubazione di 24 ore.

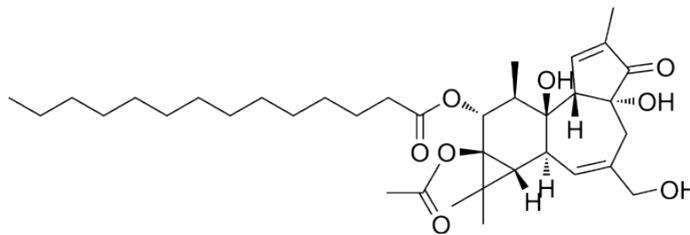


Figura 4 - Struttura chimica della PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)

### 3.2.2 Polarizzazione delle THP-1 in M1

Per indurre la polarizzazione dei monociti M0 naïve in macrofagi M1 pro-infiammatori, le THP-1 previamente indotte ad acquisire il fenotipo M0, sono state trattate con il lipopolisaccaride (LPS) o con LPS in associazione a Interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a tre diversi tempi: 3, 24 e 48 ore, sebbene nei protocolli presenti in letteratura il tempo più usato di incubazione sia 48 ore (58)(59). Al termine del trattamento, per verificarne l'efficacia, le cellule sono state processate per l'analisi dell'espressione dei marker di differenziamento tramite Real-time PCR.

In particolare, per definire le concentrazioni da utilizzare per il differenziamento, è stata testata la citotossicità delle sostanze a diverse concentrazioni con due saggi di vitalità MTT consecutivi: con il primo è stato valutato l'effetto a 48 ore, in accordo con studi precedenti (60)(61), delle concentrazioni 10, 20 e 40 ng/ml di LPS, 20 e 50 ng/ml di IFN- $\gamma$  e le combinazioni dei due fattori a 5+5, 10+10 e 20+20 ng/ml LPS+IFN- $\gamma$ ; col secondo,

è stato valutato l'effetto delle concentrazioni 10 ng/ml LPS, 10 ng/ml IFN- $\gamma$  e le combinazioni 10 + 10 e 20 + 10 ng/ml LPS e IFN- $\gamma$  poiché dal primo saggio era emersa la tossicità di IFN- $\gamma$ , sia da solo che in associazione con LPS; inoltre, volendo valutare la citotossicità in funzione del tempo, queste concentrazioni sono state saggiate sia a 3, che a 24 che a 48 ore.

In accordo con i risultati dell'MTT, per la polarizzazione degli M0 in M1 sono state quindi utilizzate due diverse concentrazioni di LPS (10 ng/ml e 40 ng/ml), una singola concentrazione di IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) e la combinazione di IFN- $\gamma$  con LPS (10 ng/ml + 10 ng/ml).

Entrambi i fattori sono stati diluiti prima dell'uso alle concentrazioni di LPS 20  $\mu$ g/ml in PBS (Phosphate-Buffered Saline) e IFN- $\gamma$  20  $\mu$ g/ml in soluzione 0.1% BSA in PBS 1x.

### **3.2.3 Polarizzazione delle THP-1 in M2**

Per indurre la polarizzazione dei monociti M0 naïve in macrofagi M2 anti-infiammatori le cellule M0 sono state stimulate con le citochine IL-4 ed IL-13 per 48 e 72 ore ad una concentrazione di 20 ng/ml + 20 ng/ml, in accordo con altri lavori disponibili in letteratura (62).

Anche in questo caso si sono costituite delle soluzioni intermedie di 20  $\mu$ g/ml in soluzione 0.1% BSA in PBS 1x rispetto alla concentrazione della soluzione iniziale di IL-4 ed IL-13 di 0,1 mg/ml.

Dal momento che, in letteratura non risulta che, sia l'IL-4 che l'IL-13, non abbiano effetto tossico sulle cellule non si è eseguito il saggio MTT per questi fattori.

## **3.3 Test del Micoplasma**

I micoplasmi sono tra i batteri più piccoli esistenti, con un diametro tra 0,2 – 0,3  $\mu$ m, caso unico tra i microorganismi procarioti ad essere privi di parete cellulare (peptidoglicano), e sono frequenti agenti contaminanti delle colture cellulari. Questi microorganismi possono modificare diversi aspetti della fisiologia e della struttura cellulare, rendendo potenzialmente non veritieri gli esperimenti condotti sulle cellule contaminate. A causa delle dimensioni molto piccole i micoplasmi riescono ad attraversare i filtri delle fiasche sterili, che invece bloccano il passaggio di specie batteriche e fungine dalle dimensioni più grandi, e una volta all'interno dell'incubatore sono poi in grado di diffondere da una

coltura all'altra. Pertanto, è essenziale monitorare ciclicamente con un apposito test tutte le colture cellulari (63).

Le THP-1 sono state testate periodicamente per la presenza del micoplasma utilizzando Mycoplasma Detection Kit (Southern Biotech)

L'esecuzione del test prevede un prelievo di un'aliquota di terreno di coltura RPMI 1640 dalla fiasca, successivamente purificato, amplificato in PCR tradizionale (Polymerase chain reaction) e valutato con elettroforesi su gel di agarosio.

### *Protocollo*

- ❖ Sotto cappa a flusso laminare si preleva 1 ml di terreno di coltura dalla fiasca delle THP-1 e si trasferisce in Eppendorf da 1.5ml;
- ❖ Si centrifuga 1000 rpm per 5 minuti per eliminare il pellet cellulare;
- ❖ Si trasferisce il surnatante in Eppendorf pulita;
- ❖ Si posiziona il campione a 99°C per 5 minuti, dopodiché si usa una centrifuga refrigerata a 4°C per centrifugare il materiale 14.000 rpm per 10 minuti.
- ❖ Al termine si elimina il surnatante e si conserva solo il pellet da risospendere bene in 50 µl di Milliq (acqua purificata e deionizzata).
- ❖ Si procede successivamente con la PCR (Polymerase Chain Reaction)

Il kit di PCR per micoplasma, conservato in congelatore a -20° prevede:

- ❖ Water (Milliq)
- ❖ Primer /dNTP's mix
- ❖ Internal Control (IC)<sup>1</sup>
- ❖ Taq Polymerase (LUNA MIX)
- ❖ Positive control (PC)<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Il ruolo di un controllo interno nella PCR è un campione o un gene di riferimento utilizzato per garantire che l'esperimento stia funzionando correttamente e per normalizzare i dati.

<sup>2</sup> Il controllo positivo è un campione noto che contiene Mycoplasma e che viene aggiunto come un normale campione alla mix di reazione che darà sicuramente risultato positivo al termine della corsa elettroforetica; dunque, permette di verificare che il sistema di rilevamento funzioni correttamente.

Per ogni campione da testare la mix si compone così:

<b>Water (Milliq)</b>	<b>6,5 µl</b>
<b>Primer /dNTP's mix</b>	<b>2,5 µl</b>
<b>Internal Control (IC)</b>	<b>1 µl</b>
<b>Taq Polymerase (LUNA MIX)</b>	<b>12,5 µl</b>
<b>Campione / Positive Control</b>	<b>2,5 µl</b>
<b>Totale</b>	<b>25 µl</b>

Tabella 2 - Mix di reazione qualitative PCR per Test del Micoplasma

Il protocollo di PCR per micoplasma deve procedere per 90 minuti, durante i quali si predispongono l'elettroforesi su gel di agarosio.

### 3.3.1 PCR

La PCR è una tecnica di biologia molecolare comunemente usata per amplificare in maniera selettiva un tratto specifico di DNA del quale si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali, partendo da un campione in cui tale tratto sia presente in singola copia o in un numero esiguo.

Le componenti indispensabili sono:

- ❖ DNA stampo
- ❖ Nucleotidi liberi (desossiribonucleotidi trifosfati, dNTP)
- ❖ Primers costituiti da brevi sequenze di DNA complementari alle estremità 3' della doppia elica di DNA
- ❖ DNA polimerasi termo-resistente
- ❖ Buffer solution (con cloruro di magnesio  $MgCl^{2-}$ )
- ❖ Acqua

È una reazione ciclica costituita da 25-35 cicli ripetuti ciascuno costituito da 3 passaggi successivi:

- ❖ La denaturazione del DNA con l'apertura della doppia elica, svolta ad una temperatura compresa tra i 94°C ed i 99°C
- ❖ L'appaiamento dei primers (sequenze oligonucleotidiche specifiche) alle regioni complementari sul filamento di DNA denaturato, eseguita ad una temperatura fra i 56°C ed i 60°C.
- ❖ La polimerizzazione, ossia l'attaccamento da parte della DNA polimerasi di nuovi deossinucleotiditrifosfato (dNTPs) a partire dai primers legati utilizzando come stampo il filamento. In questa fase la temperatura viene alzata a 68°C-72°C.

L'enzima termoresistente utilizzato è la Taq polimerasi del batterio termofilo *Thermus aquaticus*. Tale DNA polimerasi a partire dal primer incorpora un nucleotide dopo l'altro, secondo la complementarietà delle basi dell'elica a singolo filamento che fa da stampo muovendosi in direzione 5' → 3'.

La crescita degli amplificati è di tipo esponenziale e dopo n cicli da una singola molecola di DNA si otterranno 2<sup>n</sup> frammenti di DNA compresi tra i due oligonucleotidi. Con tale tecnica in tempi brevi si possono ottenere miliardi di frammenti identici a partire da una singola molecola che funge da stampo. La presenza degli amplificati viene poi analizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio.

### **3.3.2 Elettroforesi su gel di agarosio.**

È un metodo di separazione basato sulla diversa velocità di migrazione di particelle elettricamente cariche e con dimensioni e pesi differenti attraverso una matrice porosa e sotto l'influenza di un campo elettrico che favorisce la migrazione delle particelle cariche verso gli elettrodi opposti.

L'analisi dell'acido nucleico del micoplasma avviene addizionando al gel di agarosio durante la sua preparazione una sonda fluorescente per acidi nucleici, ultrasensibile e stabile, che ha sostituito nel tempo il bromuro di etidio (EtBr) usato per intercalare ssDNA, dsDNA ed RNA nei gel di agarosio e di poliacrilammide, il Gel Red Nucleic Acid Gel Stain.

Il gel solidificato nel suo stampo è posizionato nella camera elettroforetica riempita poi di TAE 1x, e vengono caricati nei pozzetti i campioni da analizzare. Nell'ultimo pozzetto viene caricato un marker (o ladder) di colore viola consistente in una miscela di molecole

di DNA, RNA o proteine di dimensioni note utilizzata come riferimento per determinare il peso molecolare o la dimensione dei frammenti visibili al transilluminatore dopo la corsa elettroforetica. La banda del controllo positivo (PC) è indispensabile per poter considerare valido il test (Figura 5).



Figura 5 – Test del micoplasma negativo per cellule THP-1

### 3.4 Analisi dell'espressione dei marcatori di differenziamento tramite RT-PCR

L'efficacia del differenziamento delle THP-1 in macrofagi M0, M1 ed M2 è stata analizzata testando l'espressione degli mRNA di alcuni marcatori specifici tramite Real Time PCR. Per questo scopo, l'RNA è stato estratto dalle cellule in piastra, retrotrascritto in cDNA e quest'ultimo successivamente amplificato in Real-Time PCR per l'analisi dell'espressione dei singoli geni.

Nella tabella sottostante sono indicati i marcatori presi in esame per ogni fenotipo:

M0	M1	M2
CD 68	TNF - $\alpha$	TGF - $\beta$
CD 71	IL-1 $\beta$	IL-10
CD 36	IL - 6	CD 206

Tabella 3 –Geni analizzati in Real time PCR

### 3.4.1 Estrazione di RNA

Per l'estrazione e la purificazione dell'RNA si è utilizzato il Total RNA Purification Kit (Norgen, Biotek Corp. Thorold, ON, Canada). La lisi cellulare è stata effettuata direttamente sul pozzetto della piastra, poi il contenuto è stato trasferito su una colonna di estrazione manuale (minispin column + collection tube) che sfrutta il principio della cromatografia a scambio ionico per trattenere selettivamente le molecole di RNA, permettendo di rimuovere le impurità.

#### *Protocollo*

- ❖ Sotto cappa a flusso laminare rimuovere e collezionare il surnatante (1 ml) e lavare ciascun pozzetto con 500 µl di PBS (Phosphate-Buffered Saline)
- ❖ Al bancone per l'estrazione rimuovere e buttare nello scarto il PBS ed aggiungere su ogni pozzetto 350 µl di Buffer RL (Buffer di lisi contenente sali di guanidina) per poi agitare 5 minuti
- ❖ Controllare al microscopio che le cellule siano effettivamente lisate, ossia che non vi sia più nulla di osservabile, e poi trasferire il lisato in Eppendorf con aggiunta di 200 µl di etanolo (EtOH) per ogni campione e vortexare per 10 secondi.
- ❖ Introdurre il materiale (550 µl totali) nella spin-column di estrazione e centrifugare 7000 rpm per 1 minuto.
- ❖ Al termine scaricare e riassemblare la spin-column ed eseguire per 3 volte consecutive i lavaggi con la Wash solution, aggiungendone ogni volta 400 µl, centrifugando 7000 rpm per 1 minuto e scaricando lo scarto dopo ogni lavaggio.
- ❖ Dopo il terzo lavaggio centrifugare ulteriormente 13000 rpm per 2 minuti per essiccare la resina.
- ❖ Portare la colonna di estrazione su una nuova Eppendorf, ed aggiungere goccia a goccia in colonna 35 µl di soluzione di eluizione per ogni campione (Elution solution A, Norgen)
- ❖ Centrifugare prima 2000 rpm per 2 minuti e poi 14000 rpm per 1 minuto e controllare che il volume sia stato correttamente eluito.

### 3.4.2 Quantificazione dell'mRNA al NanoDrop

Per la quantificazione dell'acido nucleico si raccomanda la spettrofotometria (NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer Thermo Scientific). Questa tecnica dà informazioni sulla purezza e sulla concentrazione degli acidi nucleici basandosi su uno strumento che sfrutta la capacità di questi di assorbire la luce UV con assorbimento massimo a lunghezza d'onda 260 nm. La quantità di luce assorbita è proporzionale alla quantità di acido nucleico nel campione. La quantificazione inoltre permette di studiare la purezza dell'acido utilizzando i rapporti di assorbanza a 260/280 ed a 260/230. Il rapporto 260/280 raccomandato dovrebbe essere tra 1,8 e 2,1 ma se risulta inferiore può indicare la presenza di proteine o altri contaminanti che assorbono a 280 nm, mentre il rapporto A260/230 è usato come misura secondaria della purezza degli acidi nucleici ed è un indice di contaminazione da carboidrati e fenoli o altri contaminanti. Dovrebbe presentare valore ottimale tra 2 e 2,2.

Prima del caricamento del campione è obbligatorio caricare il “bianco”, termine con cui ci si riferisce alla soluzione priva dell'analita di interesse, che calibra lo spettrofotometro e azzerava l'assorbimento del solvente. Questo assicura che il risultato si riferisca solo all'analita e non a qualsiasi altro composto nel solvente. In NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer dopo il *blanking*, lo strumento memorizza una lunghezza d'onda di riferimento della luce trasmessa e, così poi per ogni campione successivo. Le intensità del bianco e dei campioni vengono utilizzate per calcolare l'assorbimento di ogni campione secondo l'equazione:

$$\text{Assorbimento} = -\log \left( \frac{\text{Intensity}_{\text{sample}}}{\text{Intensity}_{\text{blank}}} \right)$$

La relazione tra la concentrazione e l'assorbimento è descritta dalla legge di Lambert Beer:

$$A = c \cdot \epsilon \cdot L \quad \text{anche scritta come} \quad c = A / (\epsilon \cdot L)$$

- c: concentrazione di acido nucleico in  $M(\text{moli/L})$
- A: assorbimento
- $\epsilon$ : coefficiente di estinzione molare ( $\text{L/moli} \times \text{cm}$ ).
- L: lunghezza del percorso in cm (1 cm).

### *Protocollo*

- ❖ Selezionare il tipo di campione da leggere, in questo caso RNA;
- ❖ Caricare il bianco che corrisponde ad 1 ul di Eloution solution A (Norgen) e al termine pulire la camera di lettura.
- ❖ Caricare 1 ul di campione, eseguire la lettura e trascrivere i risultati ottenuti: ng/ $\mu$ l, A260/280, A260/230, così per tutti i campioni ripulendo la camera tra uno e l'altro.
- ❖ Al termine si salva l'esperimento e si carica qualche goccia di acqua deionizzata sulla camera per poi spegnerlo dopo circa 15 minuti.

I campioni di RNA così ottenuti possono essere utilizzati subito, conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  (alcuni giorni) o a  $-80^{\circ}\text{C}$  (per tempi lunghi).

### **3.4.3 Retrotrascrizione con il kit TAKARA**

La trascrizione inversa (o retro trascrizione) è la reazione che consente la sintesi di una molecola di DNA a doppia elica a partire da un campione di RNA mediante l'uso di un enzima trascrittasi inversa (DNA polimerasi RNA-dipendente, identificata per la prima volta nei retro-virus, dai quali viene utilizzata per copiare l'informazione contenuta nel genoma ad RNA in una molecola di DNA a doppio filamento che può così integrarsi nel genoma della cellula ospite). Il DNA risultante, noto come cDNA, può essere utilizzato come modello per l'amplificazione della PCR.

Nello specifico prevede che un frammento di oligo(dT) venga utilizzato come primer per legarsi alla coda 3' di poli(A) di ciascun mRNA che la trascrittasi inversa usa come stampo per sintetizzare i filamenti di cDNA. L'ibrido RNA-cDNA risultante viene separato con un incremento di temperatura mediante l'impiego di enzimi RNasi, lasciando a singolo filamento il cDNA. Un primer gene-specifico si combina a questo e la DNA polimerasi inizia a sintetizzare il filamento di DNA complementare, iniziando dal sito di legame del primer. I filamenti vengono separati aumentando la temperatura e il ciclo PCR viene ripetuto (Figura 6).

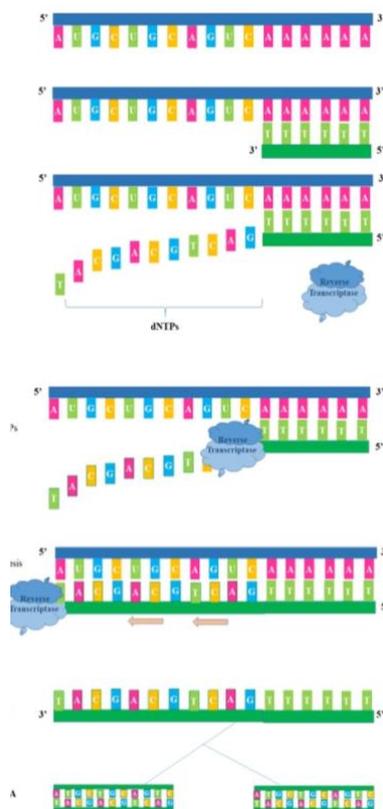


Figura 6 - Schema della RT-PCR

Per la retrotrascrizione abbiamo utilizzato il kit Takara PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA BIO). Questo kit prevede ogni tipo di contaminazione di DNA genomico grazie ad un trattamento per 2 minuti a 42° con gDNA Eraser che ha un forte potere degradante. La successiva reazione di retro-trascrizione procede poi per 15 minuti.

Nella tabella sottostante sono indicati i componenti di ciascun kit:

<b>gDNA Eraser</b>	100 µl
<b>5X gDNA Eraser Buffer</b>	200 µl
<b>PrimeScript RT Enzyme Mix I</b>	100 µl
<b>5X PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)</b>	400 µl
<b>RT Primer Mix</b>	400 µl
<b>RNase Free dH2O</b>	1ml x2
<b>EASY Dilution (for Real Time PCR)</b>	1ml x2

Tabella 4 - Composizione del Takara PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA BIO)

### Calcolo delle concentrazioni

La quantificazione del campione è necessaria per poter caricare la stessa quantità di cDNA in tutti i campioni. Per calcolare la quantità di campione da prelevare per ottenere la concentrazione desiderata viene utilizzata la seguente formula:

$$C_1: V_1 = C_2: V_2 \quad \text{da cui} \quad V_1 = \frac{C_1 \times V_2}{C_2}$$

Dove:

$C_1$  = concentrazione iniziale del campione

$V_1$  = volume del campione da prelevare (max 7  $\mu\text{L}$ )

$C_2$  = concentrazione finale (ogni misura in  $\text{ng}/\mu\text{L}$  ottenuta al NanoDrop)

$V_2$  = volume finale (1  $\mu\text{L}$  di campione letto in spettrofotometria)

Il valore  $C_1$  è un valore scelto sperimentalmente e corrisponde a 252  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Indica una quantità standard di RNA che si vuole prelevare da ciascun campione per allestire la mix di retrotrascrizione, così che i volumi di acido nucleico siano tra loro omogenei in ogni mix. Per individuarlo, come stabilito dai protocolli del laboratorio, si considerano le letture spettrofotometriche di ciascun campione durante la prima quantizzazione al NanoDrop, poi si sceglie il valore minore espresso in  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , nel nostro caso 252.

### Protocollo

- ❖ Si prende dal frigo e si scongela il kit, per poi centrifugare ciascuno dei reagenti
- ❖ Si preparano le Eppendorf necessarie e le si nominano
- ❖ Si prepara la mix 1 per la prima reazione di eliminazione di DNA genomico da introdurre nel termociclatore a 42°C per 2 minuti (sospendere molto bene prima di caricare nello strumento). Per i calcoli tenere sempre in considerazione un campione in più per avere un eccesso di soluzione.

Nella tabella che segue si riporta la composizione di ogni mix di reazione:

<b>Mix 1 (volume per campione)</b>	
Solution 2 5x gDNA Eraser buffer	2.0 $\mu$ l
Solution 1 gDNA Eraser	1.0 $\mu$ l
RNA Sample (max 7 $\mu$ l)	x $\mu$ l
Solution 6: RNase free dH2O	y $\mu$ l
<b>Volume totale</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

Tabella 5 - Mix 1 per Retrotrascrizione

- ❖ Si prepara la mix 2 per la reazione di retrotrascrizione e se ne dispensano 10  $\mu$ l in ogni Eppendorf di mix 1 già allestita. Si introduce poi nel termociclatore a 37° per 15 minuti + 85°C per 5 secondi.

Di seguito la tabella in cui si riporta la composizione della mix 2:

<b>Mix 2 (volume per campione)</b>	
Reaction solution from step 1	10 $\mu$ l
Solution 4 5x PrimeScript Buffer 2	4 $\mu$ l
Solution 3 PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 $\mu$ l
Solution 5: RT Primer Mix	1 $\mu$ l
Solution 6: RNase Free dH2O	4 $\mu$ l
<b>Volume totale</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Tabella 6 - Mix 2 per Retrotrascrizione

Al termine diluire 1:3 in MilliQ il cDNA per poi utilizzarlo come campione nella Real-time PCR.

### 3.4.4 Real time PCR

La Real-time PCR, o qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare che, seppur conservando il principio di base della PCR tradizionale, differisce per la capacità di monitorare l'amplificazione del DNA in tempo reale, nella fase esponenziale della curva di amplificazione, e non solo alla fine del processo. Questo lo fa mediante un segnale fluorescente legante la sequenza di acido nucleico di diversa natura: coloranti intercalanti come la SYBER GREEN o sonde specifiche come le Taqman o le Molecular beacons. Inoltre, permette non solo di amplificare specifiche sequenze di interesse, ma anche di quantificarle in maniera precisa durante lo svolgimento della reazione. A mano a mano che i cicli di amplificazione vengono svolti, i prodotti di amplificazione si accumulano e la fluorescenza aumenta in modo proporzionale, diventando sempre più rilevabile dal lettore ottico del detector, fino ad interpolarsi con la threshold, impostata a 0,2, definendo il cosiddetto threshold cycle o Ct. Questo parametro chiave nella qPCR rappresenta il numero di cicli necessari affinché il segnale fluorescente superi una soglia predeterminata indicativa della presenza di un prodotto di amplificazione significativo (Figura 7).

La quantificazione può essere assoluta o relativa: la assoluta determina la quantità precisa di DNA presente in un campione confrontando i valori di amplificazione con una curva standard generata da concentrazioni note di DNA. La quantificazione relativa invece confronta l'abbondanza di DNA target rispetto a un gene di riferimento (housekeeping, es  $\beta$ -actina, GAPDH o  $\alpha$ -tubulina, spesso usati come controlli interni perché espressi costitutivamente e in modo relativamente stabile in molte condizioni cellulari) che ha un'espressione costante in tutte le condizioni sperimentali. Dunque, si calcola  $\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})$ , da cui ricaviamo la Relative Expression come  $2^{-\Delta Ct}$ .

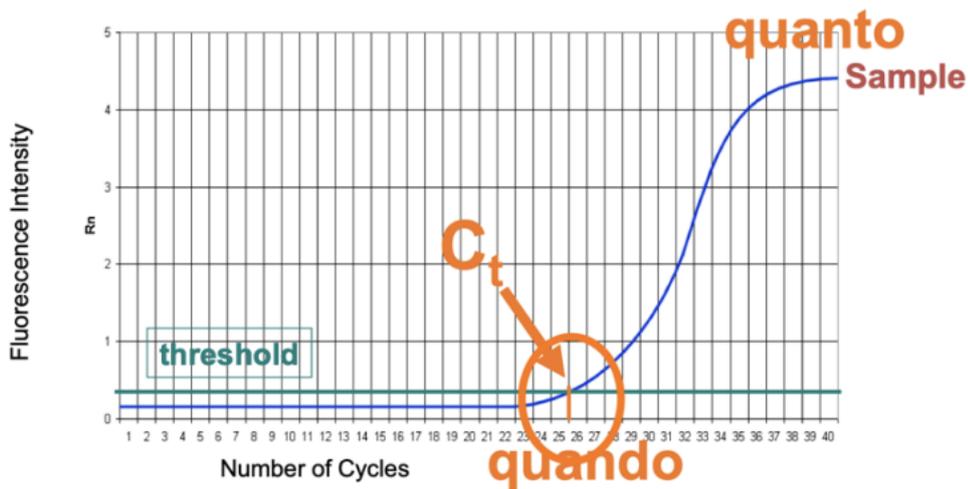


Figura 7 - Meccanismo di rilevazione del segnale di amplificazione in Real-time PCR

Per la reazione occorrono, oltre agli cDNA diluiti e all'acqua MilliQ, la mix di reazione con la sonda e i primers specifici. La mix adoperata per questo studio è la TB GreenPremix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (TAKARA BIO) che al suo interno include anche la sonda TB Green intercalante il DNA e che emette fluorescenza nella lunghezza d'onda del verde. La sonda deve essere conservata in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  e ben protetta dalla luce solare durante la sua manipolazione date le sue proprietà di fotosensibilità e termosensibilità.

I primers oligonucleotidici specifici (ditta Your Sial) sono prodotti ad una concentrazione di  $100\ \mu\text{M}$  e diluiti 1:10 in MilliQ prima dell'uso, raggiungendo una concentrazione finale  $10\ \mu\text{M}$ . La conservazione avviene mantenendoli refrigerati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Per ogni gene da analizzare si hanno un primer forward ed un primer reverse con specifiche basi azotate ed entrambi con sequenza in direzione  $5' \rightarrow 3'$ .

Il termociclatore adoperato per la Real time PCR è il Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (QUIAGEN) insieme con il software Rotor-Gene Q software. Lo strumento è dotato di un sistema sofisticato di riscaldamento/raffreddamento: il caldo è prodotto da un elemento in nichel (Ni) e cromo (Cr) nel coperchio mentre il freddo si ottiene spingendo all'esterno l'aria dalla superficie della camera. I campioni ruotano continuamente a 400 rpm durante tutta la corsa e questa centrifugazione continua previene la condensazione, rimuove le bolle d'aria e allo stesso tempo non fa formare pellet di DNA (Figura 8). Lo strumento possiede diverse sorgenti di eccitazione e altrettanti detector associati a percorsi ottici. I campioni vengono eccitati dal fondo della camera da un diodo emettitore di luce (LED). L'energia viene trasmessa attraverso le pareti sottili alla base del tubo. La

fluorescenza emessa passa attraverso filtri di emissione sul lato della camera e viene quindi raccolta da un fotomoltiplicatore (Figura 9).

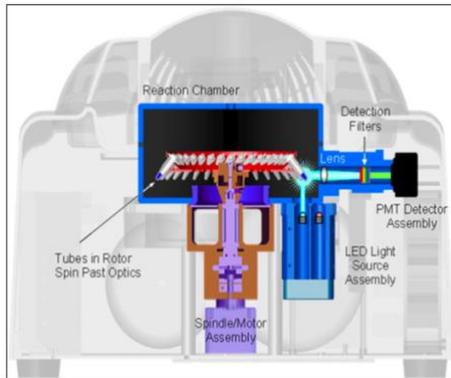


Figura 8 - Illustrazione del sistema ottico

Channel	Excitation (nm)	Detection (nm)	Examples of fluorophores detected
Blue	365±20	460±20	Marina Blue®, Edans, Bothell Blue, Alexa Fluor® 350
Green	470±10	510±5	FAM™, SYBR Green I, Fluorescein, EvaGreen®, Alexa Fluor 488
Yellow	530±5	557±5	JOE™, VIC®, HEX, TET™, CAL Fluor® Gold 540, Yakima Yellow®
Orange	585±5	610±5	ROX™, CAL Fluor Red 610, Cy®3.5, Texas Red®, Alexa Fluor 568
Red	625±5	660±10	Cy5, Quasar® 670, LightCycler® Red640, Alexa Fluor 633
Crimson	680±5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
HRM	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

Figura 9 - Canali per rilevazione ottica

*Protocollo:*

- ❖ Predisporre il piano di lavoro disinfettando con alcol 70° ogni possibile agente contaminante;
- ❖ Prendere i reagenti in frigo (4°C) ed in congelatore (primers a -20°C), scongelarli e poi centrifugarli per risospenderli (tra i primers considerare sempre la β-actina come controllo interno);
- ❖ Allestire le mix di reazione lavorando sempre in ghiaccio e considerando l'eccesso di un campione (ogni campione viene analizzato in doppio);

<b>Mix per ogni singolo campione (da moltiplicare per n. campioni)</b>	
Acqua Milliq	3.1 µl
Sonda TB Green	5.0 µl
Primer (Forward)	0.2 µl
Primer (Reverse)	0.2 µl
<b>Volume totale</b>	<b>8,5 µl</b>

Tabella 7 - Composizione della mix di Real time PCR

- ❖ Centrifugare le mix di reazione e dispensarne 8.5µl in ogni strip per PCR.
- ❖ Arrivare a volume totale 10 µl aggiungendo 1,5 µl di ogni campione nel giusto pozzetto.

- ❖ Chiudere ogni strip con un apposito set di tappi.
- ❖ Caricare i campioni nello strumento rispettando il giusto ordine, scegliendo il giusto rotore (72 well), il corretto volume di campione (10 µl), la giusta lunghezza d'onda di rilevazione (Green 470 – 510 nm) ed avviando il protocollo corretto (Takara cDNA).

La reazione deve procedere per 90 minuti con una prima fase di inizializzazione 95°C per 30 secondi per attivare la polimerasi e denaturare il DNA e poi prosegue per 40 cicli di amplificazione con denaturazione a 95°C per 5-10 secondi ed annealing a circa 60°C per 30 secondi. La temperatura di annealing varia in base alla temperatura di melting:

$$Tm = (4 \times [G + C] + 2 [A + T])^{\circ}C$$

Al termine si procede con la nomina dei campioni, la scelta di un valore di threshold, e l'applicazione della funzione di slope, ossia di una funzione di correzione della pendenza della curva di amplificazione che idealmente, in una curva ottimale dovrebbe essere compresa tra -3.1 e -3.6 (in scala logaritmica). Infine, si esegue il calcolo del  $\Delta C_t$ , con il gene housekeeping  $\beta$ -actina ed il calcolo della *Relative Expression* ( $2^{-\Delta C_t}$ ).

### **3.5 Analisi della citotossicità con saggio MTT**

Per determinare le dosi di LPS e IFN- $\gamma$  utilizzabili negli esperimenti di differenziamento delle cellule M0 in M1 si è testata la loro citotossicità mediante saggio MTT.

#### *MTT saggio di vitalità*

Il saggio colorimetrico MTT inventato nel 1983 (64) è utilizzato per la misurazione dell'attività metabolica cellulare, indice della proliferazione, della vitalità e della citotossicità di cellule trattate e saggiate. Si basa sull'impiego di un sale di mono tetrazolio di colore giallo ((bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, o MTT)) che da un punto di vista di struttura chimica si presenta con un anello tetrazolico quaternario carico positivamente contenente quattro atomi di azoto e circondato da tre anelli aromatici di cui due porzioni feniliche e un anello tiazolico (Figura 10).

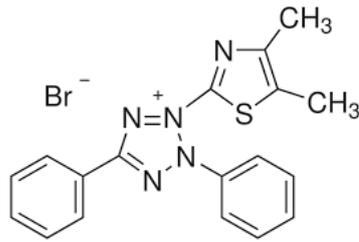


Figura 10 - Struttura chimica del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Il sale oltrepassa la membrana cellulare e la membrana mitocondriale interna grazie alla sua carica positiva e alla sua struttura lipofila e qui viene ridotto a formazano ad opera dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (enzima reduttasi NAD(P)H-dipendente), che funziona solo in cellule metabolicamente attive. La reazione di riduzione dell'MTT si manifesta concretamente con la rottura dell'anello di tetrazolio e la formazione di cristalli insolubili in acqua di colore blu/viola, appunto cristalli di formazano. I cristalli depositati sul fondo sono poi solubilizzati con il DiMetilSolfOssido (DMSO) e il prodotto viene analizzato misurando l'assorbanza di ogni pozzetto a 540 nm con uno spettrofotometro per piastre multiwell. Fondamentale è creare più replicati tecnici per ogni condizione analizzata sulla quale calcolare poi un valore di media, e altrettanto importante per il saggio è introdurre il bianco tra i replicati in piastra, senza il quale non potrebbero essere calcolate le percentuali di vitalità.

La percentuale di vitalità viene calcolata come:

$$\text{Vitalità cellulare (\%)} = \frac{\text{media assorbanze campionarie}}{\text{media assorbanze bianco}} \times 100$$

Rispetto ad un valore di vitalità assoluta pari al 100%, si considerano vitalità accettabili su campioni di cellule che abbiano subito determinati trattamenti percentuali fino al 75%.

#### *Saggio MTT nelle THP-1 (M0)*

Prima di analizzare l'efficacia del trattamento con LPS e IFN- $\gamma$  nell'indurre il differenziamento dei macrofagi M0 in M1, le concentrazioni LPS 10, 20, e 40 ng/ml, IFN- $\gamma$  10, 20 e 50 ng/ml, e le combinazioni 5+5, 10 +10, 20 + 10 e 20 + 20 ng/ml LPS+IFN $\gamma$ , sono state testate per la loro citotossicità a tempi variabili tra 3, 24 e 48 ore.

Si è proceduto nel seguente modo:

**Giorno 1:** 30.000 cells/well di THP-1 sono state seminate in una piastra 96 well con PMA per ottenere per ottenere monociti M0. Per ognuna delle condizioni da testare, incluso il controllo non addizionato di fattori pro-differenzianti, si sono realizzati 4 replicati tecnici in piastra.

**Giorno 2:** dopo 24 ore di incubazione il terreno di coltura è stato sostituito con RPMI addizionato con LPS e IFN- $\gamma$ . Come controllo si è utilizzato terreno RPMI non addizionato con i fattori pro-differenzianti.

**Giorno 3:**

- ❖ Dopo altre 24 ore si sostituiscono i 100  $\mu$ l di terreno vecchio con 100  $\mu$ l di nuovo RPMI non addizionato;
- ❖ Si aggiungono 10 $\mu$ l di soluzione MTT, previamente preparata sciogliendo la polvere in PBS, come descritto nel protocollo del produttore, in ogni pozzetto;
- ❖ Si lasciano i campioni nell'incubatore per cellule per 4 ore e al termine si blocca la reazione aspirando la soluzione ma non i cristalli depositati sul fondo;
- ❖ Si aggiungono 100  $\mu$ l di DMSO mescolando accuratamente;
- ❖ Si porta la piastra allo spettrofotometro e a 540 nm si effettua la lettura dell'assorbanza;
- ❖ I dati vengono esportati in un software di calcolo (Excel) su cui si calcola il valore medio di assorbanza per ogni condizione saggiata. La media di ogni concentrazione di nostro interesse viene rapportata al valore della media del controllo, ricavando in valore assoluto il risultato sulla vitalità cellulare. E' sufficiente moltiplicare il risultato per 100 per ricavare un valore percentuale di vitalità.

## 4 Risultati

Il modello cellulare THP-1 è ampiamente usato in ambito di ricerca per lo studio dei macrofagi e il differenziamento delle THP-1 in M0, M1 e M2 tanto che diversi protocolli sono disponibili in letteratura (54). Nonostante gli studi evidenziati si basino sull'utilizzo degli stessi agenti differenzianti, manca conformità nelle concentrazioni e nelle tempistiche di utilizzo. Le discrepanze riscontrate nei protocolli di differenziamento presenti in letteratura, ci hanno indotto a mettere a punto e standardizzare il protocollo. Per la valutazione dell'avvenuto differenziamento di tutti e tre i citotipi macrofagici allestiti è stato osservato l'aspetto fenotipico al microscopio ottico invertito a contrasto di fase ed è stata analizzata l'espressione di marker specifici.

### 4.1 Differenziamento di cellule Thp-1 in monociti M0

Per il differenziamento delle cellule THP-1 in M0 sono state testate tre diverse concentrazioni di PMA: 10, 50 e 100 ng/ml, per un tempo di trattamento di 24 ore. Ad una prima osservazione delle cellule al microscopio ottico invertito a contrasto di fase è emerso che tutte le concentrazioni di PMA utilizzate hanno indotto un cambiamento fenotipico: le cellule sono passate da una condizione di crescita in sospensione ad una in adesione (Figura 11).

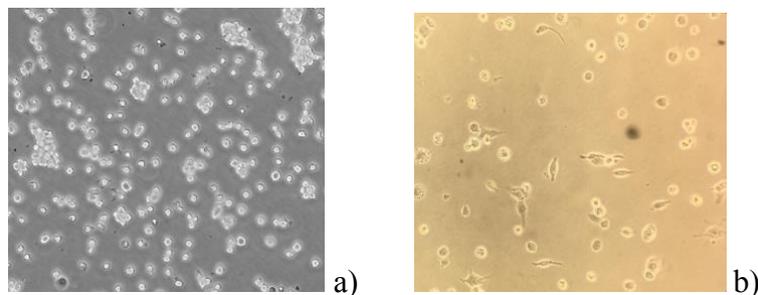


Figura 11 - Confronto tra cellule in sospensione (a) e cellule in adesione (b) ottenute dopo incubazione con la PMA (50 ng/ml) per 24h. Ingrandimento 10x Da un punto di vista morfologico si osserva l'adesione delle cellule a seguito del trattamento.

L'effetto delle 3 diverse dosi di PMA nel differenziamento delle THP-1 in M0 è stato analizzato a livello molecolare tramite Real Time PCR (RT-PCR) valutando l'espressione degli mRNA di CD36 e CD71, markers specifici di macrofagi naïve, la cui espressione dovrebbe aumentare negli M0 rispetto a cellule non trattate, e di CD68, la cui espressione dovrebbe rimanere stabile tra cellule THP-1 e macrofagi M0 (66) (Figura 12).

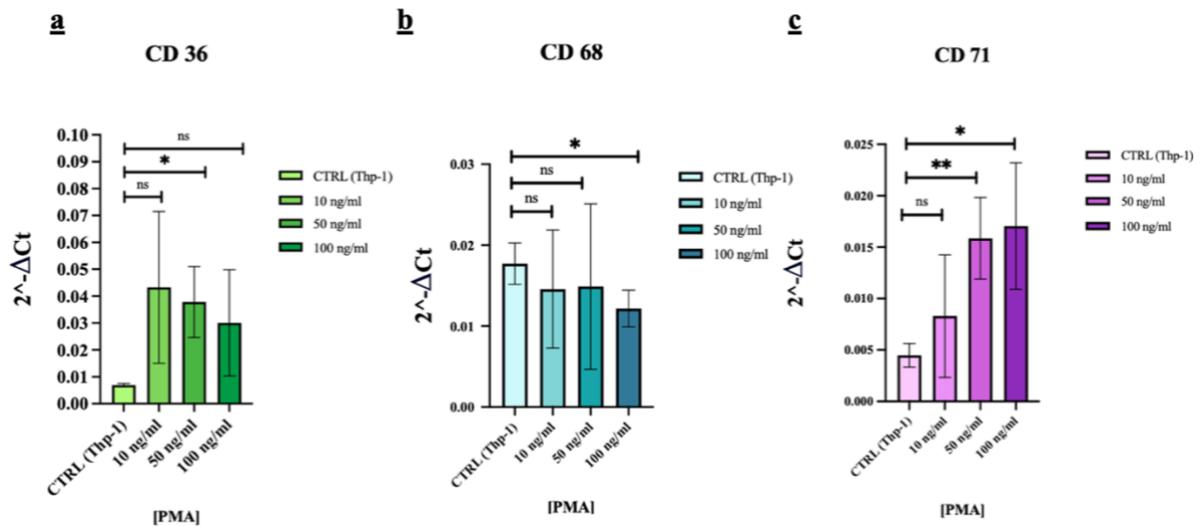


Figura 12 – Analisi di espressione di marcatori per macrofagi M0. L’espressione di CD36, CD68 e CD71 in cellule THP-1 trattate per 24 ore con PMA a 10-, 50- e 100- ng/ml è stata valutata tramite RT-PCR. Risultati espressi come relative expression  $2^{-\Delta Ct}$  e usando  $\beta$ -Actina come gene normalizzatore. Il controllo è rappresentato da cellule THP-1 non trattate. Per l’analisi statistica si è adoperata la funzione Two sample t test Prism® 5.0 (GraphPad, USA), media  $\pm$  DS (n=3). **a**, Espressione genica di CD36 a 10 ng/ml PMA (ns) ( $0,043286 \pm 0,028236$ ), 50 ng/ml PMA (\*  $p < 0,05$ ) ( $0,0378667 \pm 0,013191$ ) e 100 ng/ml PMA (ns) ( $0,030058 \pm 0,019771$ ). **b**, Espressione di CD68 a 10 ng/ml PMA (ns) ( $0,014574 \pm 0,007293$ ), 50 ng/ml PMA (ns) ( $0,014905 \pm 0,010219$ ) e a 100 ng/ml PMA (\*  $p < 0,05$ ) ( $0,012172 \pm 0,002276$ ). **c**, Espressione di CD71 a 10 ng/ml PMA (ns) ( $0,008297 \pm 0,005958$ ), 50 ng/ml PMA (\*\*  $p < 0,01$ ) ( $0,015852 \pm 0,003967$ ) e 100 ng/ml PMA (\*  $p < 0,05$ ) ( $0,017051 \pm 0,006160$ ).

L’analisi dei dati mostra un aumento significativo nelle cellule stimulate rispetto a quelle non trattate di CD 36 e CD71 ed un mantenimento dell’espressione di CD68 con concentrazione 50 ng/ml PMA. La dose 10 ng/ml non mostra variazioni significative per nessuno dei markers analizzati, mentre la concentrazione di 100 ng/ml induce un aumento significativo di espressione del CD71, ma non del CD36, e determina una riduzione del CD68.

Complessivamente, l’analisi ha permesso di stabilire che la concentrazione ottimale di PMA necessaria per i successivi esperimenti di polarizzazione degli M0 in M1 ed M2 è di 50 ng/ml PMA.

## 4.2 Polarizzazione di monociti M0 in M1

Il protocollo classico per la polarizzazione verso M1 prevede la stimolazione degli M0 con LPS, da solo o in combinazione con IFN- $\gamma$ . In letteratura sono presenti diversi protocolli con concentrazioni e tempi di incubazione variabili (67). Dovendo allestire il protocollo di polarizzazione, prima di tutto, è stata analizzata la citotossicità di LPS ed

IFN- $\gamma$  e della loro associazione, utilizzati per il trattamento a diverse concentrazioni e tempistiche.

#### 4.2.1 Valutazione della citotossicità di LPS e IFN- $\gamma$

L'effetto sulla vitalità cellulare di LPS e IFN- $\gamma$  è stato valutato tramite il saggio MTT a 48 ore di trattamento seguendo il protocollo descritto nei materiali e metodi. Le concentrazioni testate, scelte in funzione dei protocolli diffusi in letteratura (60)(61)(68), sono state inizialmente di 10, 20 e 40 ng/ml per il LPS, e di 20 e 50 ng/ml per l'IFN- $\gamma$ . Per il trattamento combinato di LPS e IFN- $\gamma$  le concentrazioni testate sono state 5+5, 10+10 e 20+20 ng/ml LPS e IFN- $\gamma$  (Figura 13).

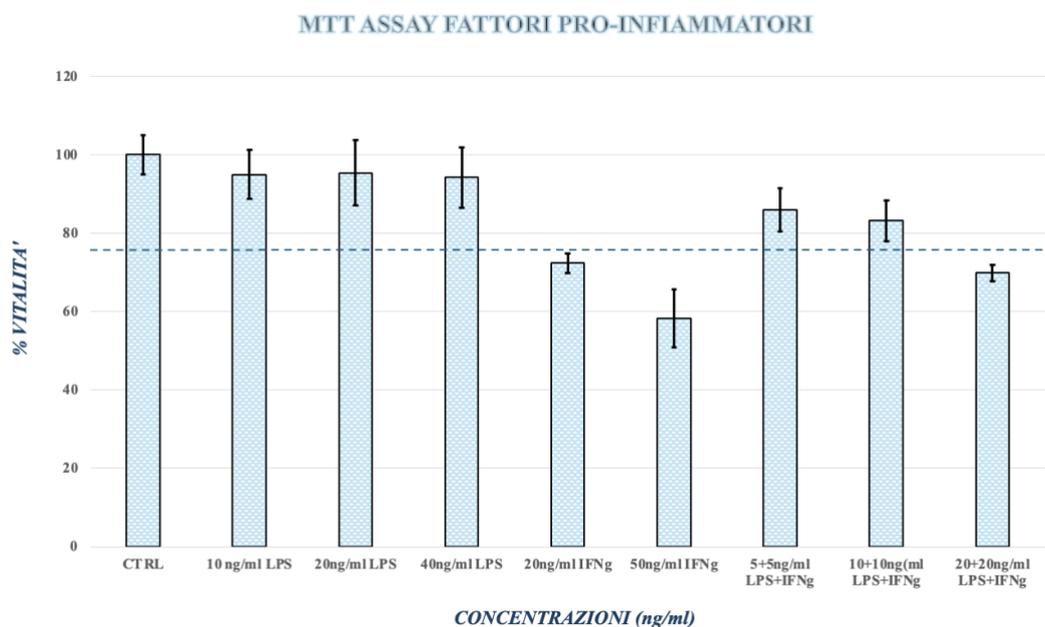


Figura 13 – Risultati di MTT Assay su monociti M0 stimolati per 48 ore con LPS ed IFN- $\gamma$  a diverse concentrazioni. Il valore soglia di vitalità viene posto al 75% e come controllo (CTRL) si sono usati monociti M0 non trattati. I dati sono riportati come valore medio  $\pm$  DS (n=4). Rispetto al valore di cut off, le concentrazioni 10, 20 e 40 ng/ml LPS e le combinazioni 5+5 e 10+10 ng/ml LPS + IFN- $\gamma$  risultano non tossiche, mentre 20 e 50 ng/ml IFN- $\gamma$  e 20+20 ng/ml LPS e IFN- $\gamma$  presentano una vitalità inferiore al 75% rispettivamente di 72,36 % ( $\pm$  0,0247289), 58,36 % ( $\pm$  0,073828) e 69,85 % ( $\pm$  0,051116).

Come mostrato dal grafico, le concentrazioni 20 e 50 ng/ml IFN- $\gamma$  e la combinazione 20+20 ng/ml LPS e IFN- $\gamma$  si sono rivelate tossiche, in quanto la vitalità cellulare è al di sotto del valore soglia del 75%. Pertanto, poiché l' IFN- $\gamma$  presenta una elevata citotossicità, è stato testato ad una dose minore (10 ng/ml) sia come trattamento singolo che in combinazione con LPS alle concentrazioni già testate (10 o 20 ng/ml) anche a tempi

minori (3 e 24 ore); questo saggio ha permesso anche di avere un'idea della citotossicità dei trattamenti in funzione del tempo (Figura 14).

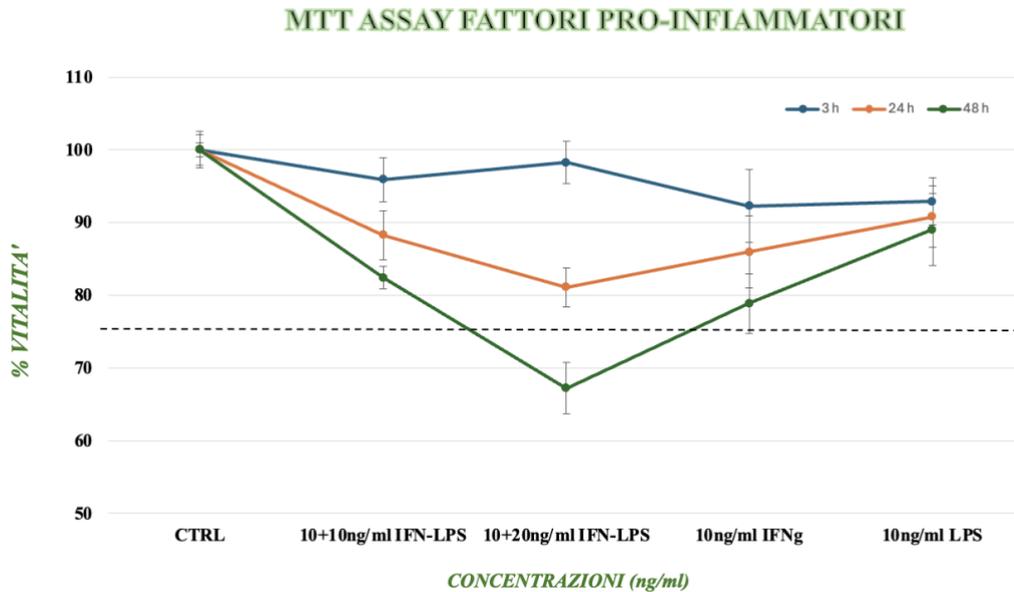


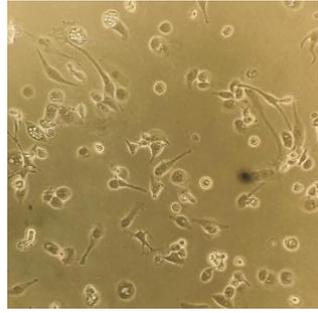
Figura 14 - Rappresentazione grafica dei risultati di un MTT Assay su monociti M0 stimolati per 3, 24 e 48 ore con LPS ed IFN- $\gamma$  a diverse concentrazioni. Il valore soglia di vitalità viene posto al 75% e come controllo (CTRL) si sono usati monociti M0 non trattati. I dati sono riportati come valore medio  $\pm$  DS (n=4). Rispetto al valore soglia solo la concentrazione 10+20 ng/ml IFN- $\gamma$  ed LPS risulta tossica, con una percentuale di vitalità del 67,22 % ( $\pm$  3,50754).

L'analisi mostra un'assenza di citotossicità a tre ore per tutti i fattori considerati ed un aumento progressivo nel tempo nel trattamento combinato, in particolare con l'associazione 20 ng/ml LPS e 10 ng/ml IFN- $\gamma$ . Tuttavia, l'associazione 10 ng/ml LPS e 10 ng/ml IFN- $\gamma$  mostra una vitalità dell'82,5%, al di sopra della soglia fissata al 75% e non eccessivamente tossica, anche ad un tempo prolungato di trattamento (48 ore) e per tale ragione si è deciso di procedere con l'analisi dei marcatori di polarizzazione M1 trattando le cellule con LPS 10ng/ml, IFN- $\gamma$  10ng/ml e la loro associazione 10+10 ng/ml.

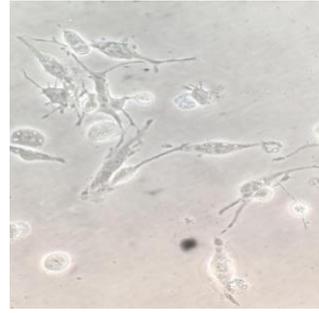
#### 4.2.2 LPS e IFN- $\gamma$ inducono la polarizzazione degli M0 in M1

L'effetto del trattamento con LPS e IFN- $\gamma$  e la loro associazione è stato testato sia sulla morfologia cellulare (Figura 15) che sull'espressione dei markers specifici IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  ai tempi 3, 24 e 48 ore. In particolare, è stata valutata l'espressione dei loro mRNA in RT-PCR. (Figura 16).

Il cambiamento di espressione genica dovuto al trattamento con LPS e INF- $\gamma$  è accompagnato anche da un cambiamento fenotipico delle cellule, osservabile al microscopio ottico invertito a contrasto di fase.

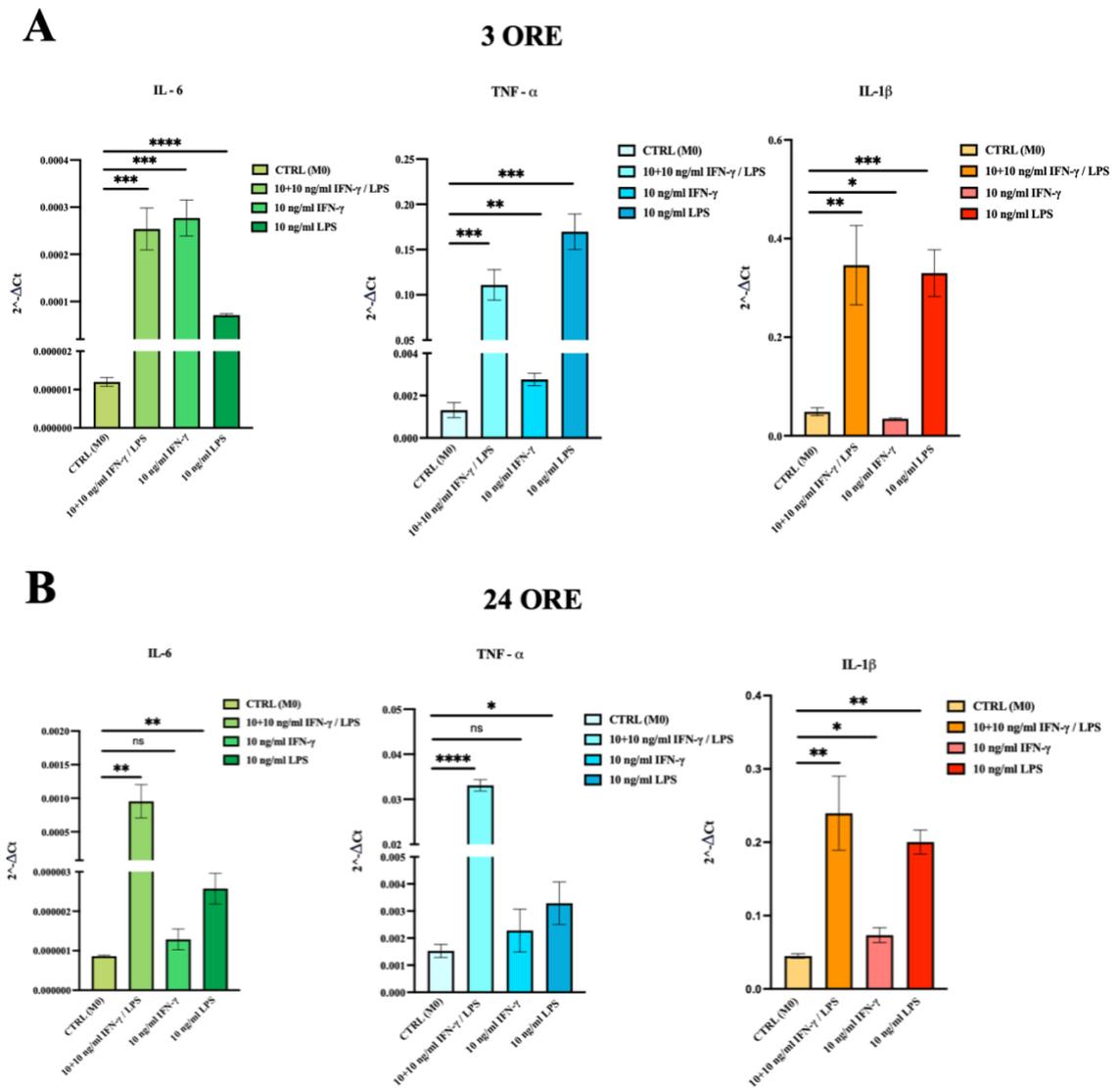


A)



B)

Figura 15 – Polarizzazione dei macrofagi M0 in M1. Le cellule M0 trattate (A, ingrandimento 10X) sono state stimulate con LPS + IFN- $\gamma$  (10+10 ng/ml) per 48h. L'immagine B (ingrandimento 20X) mostra le cellule polarizzate con forma più allungata ed irregolare e marcate prominente citoplasmatiche.



C

48 ORE

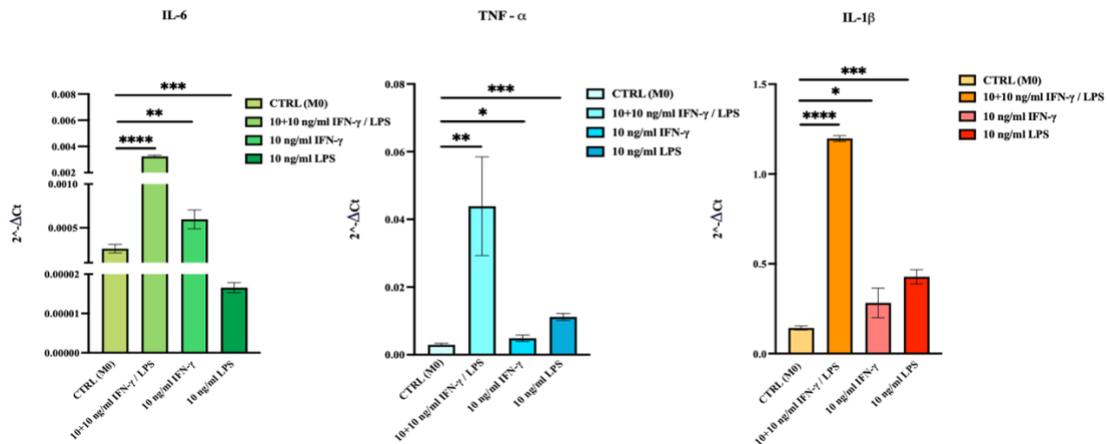


Figura 16 – Espressione di IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  in cellule M0 trattate con LPS e IFN- $\gamma$  a 3 (A), 24 (B) e 48 ore (C). I grafici indicano la variazione dell'espressione relativa dei markers a seguito del trattamento con 10+10 ng/ml LPS-IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IFN- $\gamma$  e 10 ng/ml LPS rispetto alle cellule M0 non trattate (CTRL M0). Misurazione attraverso il metodo  $2^{-\Delta Ct}$  usando  $\beta$ -Actina come gene normalizzatore. Per l'analisi statistica si è usata la funzione Two sample t test Prism® 5.0 (GraphPad, USA). I dati vengono presentati come media  $\pm$  DS (n=3). n.s. = no significatività, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . **A)** Espressione genica di TNF- $\alpha$  molto significativa a 10 ng/ml LPS (\*\*\*)  $p < 0,001$  ( $0,169748 \pm 0,019631$ ) e a 10+10 ng/ml LPS-IFN- $\gamma$  (\*\*\*)  $p < 0,001$  ( $0,111024 \pm 0,016856$ ). Anche per IL-1 $\beta$  si osserva un aumento significativo a 10+10 ng/ml LPS-IFN- $\gamma$  (\*\*  $p < 0,01$ ) ( $0,345972 \pm 0,080517$ ) e a 10 ng/ml LPS (\*\*\*)  $p < 0,001$  ( $0,329806 \pm 0,047533$ ). **B)** TNF- $\alpha$  mantiene una differenza molto significativa al trattamento combinato (\*\*\*)  $p < 0,001$  ( $0,033086 \pm 0,001276$ ). **C)** TNF- $\alpha$  risulta significativo rispetto al controllo a 10+10 ng/ml LPS-IFN- $\gamma$  (\*\*  $p < 0,01$ ) ( $0,043889 \pm 0,014589$ ) e a 10 ng/ml LPS (\*\*\*)  $p < 0,001$  ( $0,011171 \pm 0,001041$ ). IL-1 $\beta$  aumenta significativamente nella combinazione 10+10 ng/ml LPS ed IFN- $\gamma$  (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) ( $1,197555 \pm 0,016601$ ).

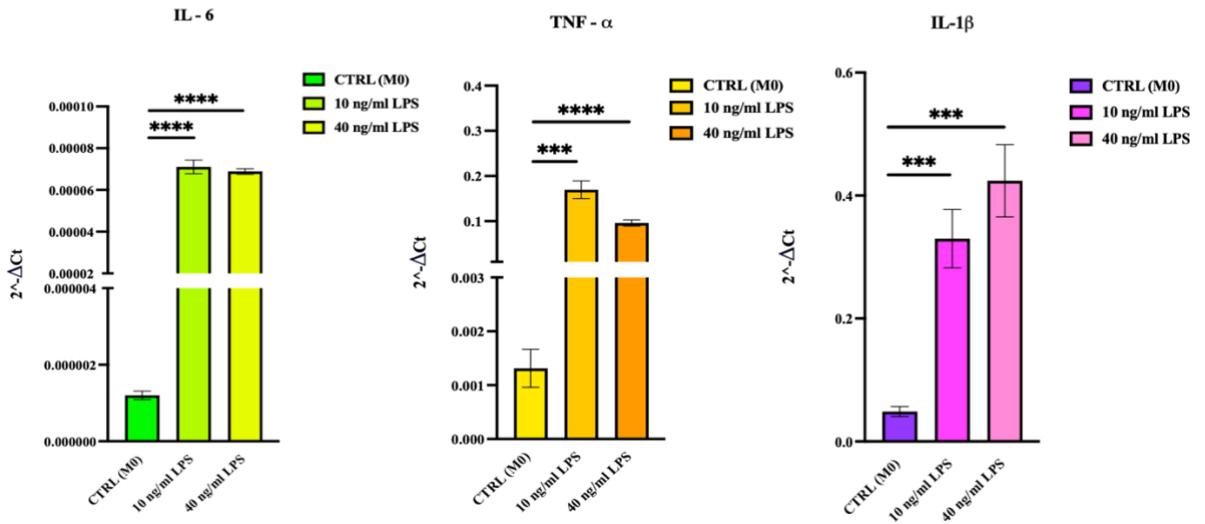
L'analisi dei dati mostra un aumento significativo di tutti e tre i markers con il trattamento combinato LPS+IFN- $\gamma$  già a partire dalle 3 ore, e tale effetto si conserva nell'arco del tempo fino alle 48 ore. Per TNF- $\alpha$  si osserva il picco di espressione a 3 ore dal trattamento, al contrario IL-1 $\beta$ , nonostante abbia una espressione significativamente aumentata già a 3 ore, mostra il suo picco di espressione a 48 ore. La stessa analisi mostra che il trattamento col solo IFN- $\gamma$  non ha particolare effetto sull'espressione dei marcatori analizzati, a differenza dell'LPS, il cui effetto è molto significativo a tempi brevi, ma minore rispetto all'associazione con l'IFN- $\gamma$  a 24 e 48 ore.

L'analisi dell'espressione dell'IL-6 in RT-PCR non ha fornito un risultato soddisfacente, in quanto i livelli di espressione del mRNA di questa citochina non sono sufficientemente rilevabili tramite RT-PCR, nonostante si possa dedurre un aumento dei livelli di espressione.

Vista la risposta significativa delle cellule a 3 ore con 10 ng/ml di LPS, è stato valutato se l'effetto è più protratto nel tempo aumentando la concentrazione a 40 ng/ml. L'analisi dei dati mostra un effetto di LPS di induzione dell'espressione di citochine pro-infiammatorie che si mantiene maggiormente con 40 rispetto a 10 ng/ml di LPS fino a 24 ore; tuttavia, a 48 ore non si notano differenze significative (Figura 17).

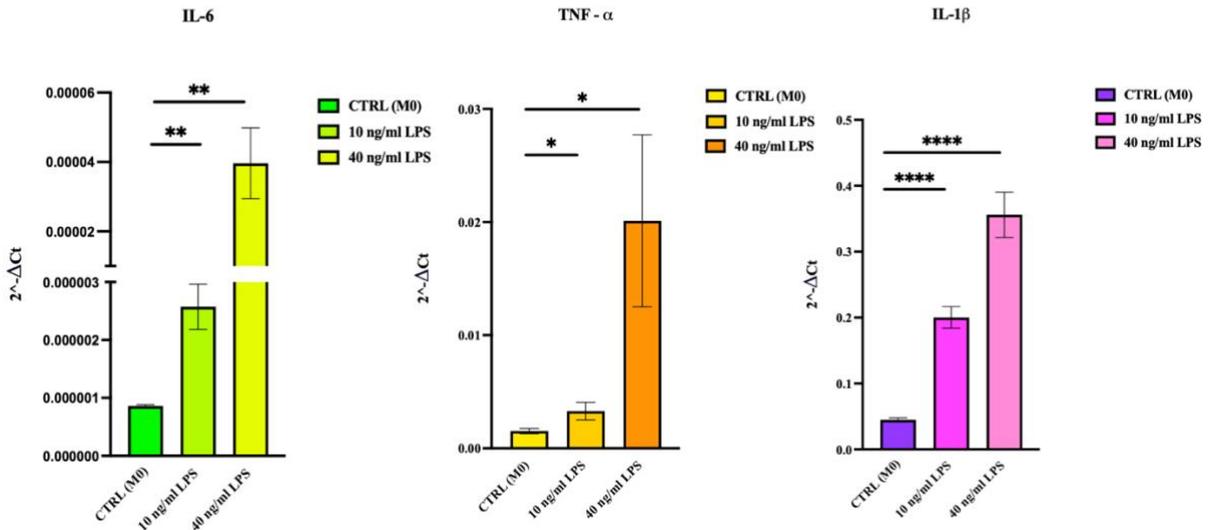
**A**

**3 ORE**



**B**

**24 ORE**



C

48 ORE

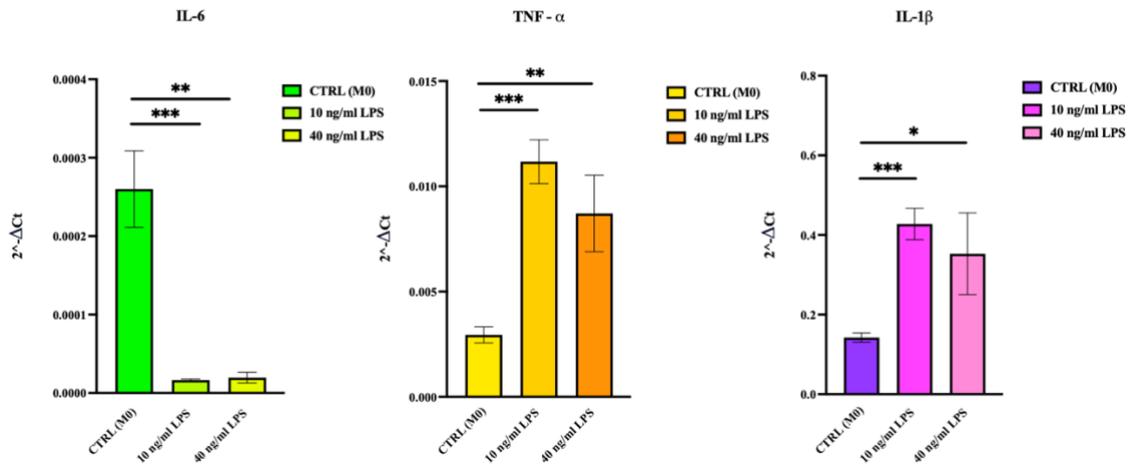


Figura 17 - Espressione di IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  in cellule M0 trattate con LPS 10 e 40 ng/ml. Espressione genica relativa di IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a 3 (A), 24 (B) e 48 ore (C) in cellule M0 trattate con LPS (10 e 40 ng/ml) rispetto al controllo non trattato (CTRL M0). Metodo  $2^{-\Delta C_t}$  usando  $\beta$ -Actina come gene normalizzatore. Per l'analisi statistica si è adoperata la funzione Two sample t test Prism® 5.0 (GraphPad, USA). I dati vengono presentati come media  $\pm$  DS (n=3). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. A) Espressione genica significativa per TNF- $\alpha$  a 10ng/ml (\*\*\* p < 0,001) (0,169748  $\pm$  0,019631) ed a 40 ng/ml LPS (\*\*\*\* p < 0,0001) (0,096116  $\pm$  0,006997) rispetto al controllo. IL-1 $\beta$  aumenta significativamente a 10 ng/ml LPS (\*\*\* p < 0,001) (0,329806  $\pm$  0,047533) ed a 40 ng/ml LPS (0,424049  $\pm$  0,058785) rispetto a CTRL (M0) B) Si osserva una differenza significativa nell'espressione di IL-1 $\beta$  a 40 ng/ml LPS (\*\*\*\* p < 0,0001) (0,355905  $\pm$  0,007604) e 10 ng/ml LPS (\*\*\*\* p < 0,0001) (0,200252  $\pm$  0,016454). C) TNF- $\alpha$  molto significativo a 10 ng/ml LPS (\*\*\* p < 0,001) (0,011171  $\pm$  0,001041) e significativo a 40 ng/ml LPS (\*\* p < 0,01) (0,00871176  $\pm$  0,001817037). IL-1 $\beta$  molto significativo a 48 ore a 10 ng/ml LPS (\*\*\* p < 0,001) (0,427497  $\pm$  0,039532).

### 4.3 Polarizzazione di monociti M0 in M2

La polarizzazione degli M0 in M2 è stata indotta stimolando gli M0 con IL-4 in combinazione con IL-13. In accordo con la letteratura scientifica (62), questi fattori sono stati utilizzati ad una concentrazione 20+20 ng/ml per 48 e 72 ore.

Come descritto per il differenziamento degli M1, per caratterizzare la polarizzazione degli M2 si è osservato l'aspetto fenotipico (Figura 18) e si è eseguita un'analisi quantitativa dei livelli di espressione genica di mediatori chimici specifici, ovvero le citochine anti-infiammatorie TGF- $\beta$ , IL-10 e CD206, tramite RT-PCR (Figura 19).

Il cambiamento di espressione genica dovuto al trattamento per 48 e 72 ore è accompagnato anche da un cambiamento fenotipico delle cellule, osservabile al microscopio ottico invertito a contrasto di fase.

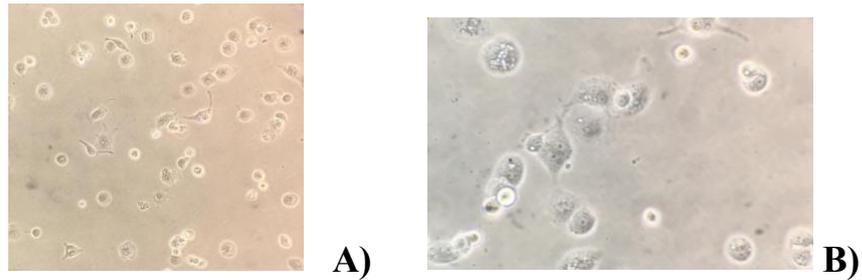


Figura 18 - Aspetto fenotipico di macrofagi M0 polarizzati a macrofagi M2: ingrandimento 10x (A) E 20X (B). All'osservazione al microscopio ottico invertito si nota una forma cellulare molto arrotondata, con organuli e granuli citoplasmatici, utili alla produzione di fattori di riparazione. Si nota una maggior somiglianza con i monociti M0, da cui M1 ed M2 sono derivati, rispetto agli M1.

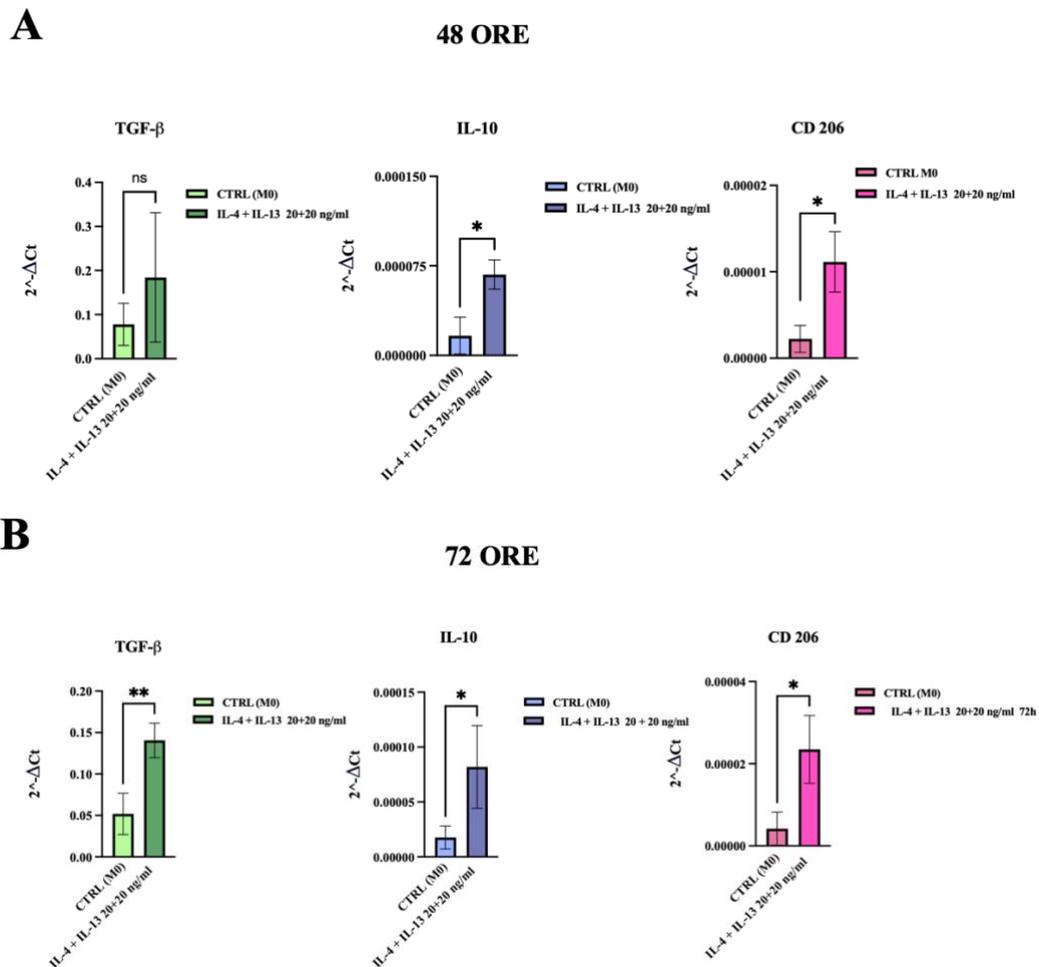


Figura 19 – Espressione di TGF- $\beta$ , IL-10 e CD206 in cellule M0 indotte a polarizzare verso il fenotipo M2 a 48 ore (A) e 72 ore (B) di trattamento delle cellule M0 con IL-4 e IL-13 (20+20 ng/ml rispettivamente) rispetto alle cellule non trattate (CTRL M0). Metodo  $2^{-\Delta Ct}$  usando  $\beta$ -Actina come gene normalizzatore. Per l'analisi statistica si è adoperata la funzione Two sample t test Prism® 5.0 (GraphPad, USA). I dati vengono presentati come media  $\pm$  DS (n=3). n.s. = non significatività, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . **A**) Espressione genica di CD206 ( $0,0000111473 \pm 0,00000349273$ ) e di IL-10 ( $0,0000676464 \pm 0,0000122679$ ) significativa (\*  $p < 0,05$ ), ma molto bassa. **B**) Significativi i livelli di CD206 (\*  $p < 0,05$ ) ( $0,0000234682 \pm 0,00000825533$ ) e di IL-10 (\*  $p < 0,05$ ) ( $0,0000819571 \pm 0,0000376286$ ) a 72 ore rispetto al controllo. Espressione significativa di TGF- $\beta$  (\*\*,  $p < 0,01$ ) ( $0,140503733 \pm 0,020733923$ ) a 72 ore.

Dall'analisi effettuata emerge che i livelli di espressione di IL-10 e CD206 risultano estremamente bassi sia sulle cellule non stimulate che su quelle stimulate; tuttavia, nonostante i bassi livelli di espressione si osserva un lieve incremento sia a 48 che a 72 ore. Al contrario i livelli di espressione del TGF- $\beta$  sono aumentati significativamente a 72 ore.

## 5 Discussione

Il ruolo dei macrofagi nella risoluzione dell'inflammation è noto ormai da tempo, così come la loro capacità di differenziarsi nei due fenotipi distinti, M1 e M2, in risposta agli stimoli ricevuti.

Al fine di studiare l'attività dei diversi fenotipi che un monocita può assumere dopo aver acquisito le caratteristiche di macrofago M0, è molto utile utilizzare modelli *in vitro* che mimino le caratteristiche di queste cellule *in vivo*. Per questo motivo in molti studi scientifici vengono descritte le condizioni per ottenere un modello funzionale di macrofagi M1 ed M2. I protocolli tuttavia differiscono per trattamento, concentrazioni degli stimoli usati e tempi.

Vista la necessità di ottenere macrofagi M0, M1 ed M2 per studiare la loro capacità di apprendimento, ovvero una sorta di memoria immunologica dell'immunità innata, come descritto nell'introduzione e poi nello scopo del lavoro di tesi, nel periodo di frequenza nel laboratorio di Patologia Clinica (UNIVPM), mi sono occupata di mettere a punto un protocollo di differenziamento di questi sottotipi cellulari partendo da una linea cellulare mieloide, derivata da leucemia mieloide acuta, le THP-1, diffusamente utilizzata per lo studio dei macrofagi.

Per questo motivo, partendo dall'analisi degli altri studi, mi sono occupata di analizzare l'effetto di diverse condizioni e tempistiche di stimolazione cellulare, per poi caratterizzare l'efficacia del trattamento sul cambiamento fenotipico e sull'espressione di markers specifici in vari sottotipi macrofagici mediante analisi Real Time PCR.

Dal punto di vista fenotipico, le cellule ad ogni trattamento sono state analizzate morfologicamente al microscopio: le cellule THP-1 crescono in sospensione ma, una volta indotte a differenziare aderiscono alla piastra assumendo una morfologia allargata. La successiva polarizzazione degli M0 induce un ulteriore cambiamento morfologico che si associa ad una variazione dell'espressione dei marker specifici per ogni tipologia studiata.

Nell'indurre il differenziamento degli M0 si è tenuto conto dell'effetto della PMA stimolante l'espressione di markers specifici, CD36 e CD71, nel mantenimento stabile del CD68, marcatore che nei macrofagi M0 non dovrebbe risultare ridotto rispetto a THP-1 non differenziate (66). Partendo dalle indicazioni già presenti in letteratura, le THP-1 sono state indotte a differenziare in M0 con diverse concentrazioni di PMA (10, 50 e 100 ng/ml).

Dai risultati emerge che la concentrazione ottimale, *in vitro*, per indurre il differenziamento delle cellule THP-1 in sospensione verso macrofagi M0 aderenti è di 50 ng/ml di PMA. A 10 ng/ml, nonostante si osservi un incremento dell'espressione dei marker di differenziazione, l'effetto non è significativo per il differenziamento in monociti M0. Al contrario, una concentrazione di 100 ng/ml, pur mostrando un effetto differenziante elevato, presenta una variabilità eccessiva nei dati e una riduzione di espressione del CD68 nelle cellule trattate.

I macrofagi M0 così ottenuti sono stati quindi trattati per indurre la polarizzazione in senso M1 ed M2. Per la polarizzazione verso il fenotipo M1, pro-infiammatorio, le cellule M0 sono state stimulate con LPS (endotossina batterica) e IFN- $\gamma$  (citochina prodotta dai linfociti T) mentre per la polarizzazione in M2 con IL-4 e IL-13. Prima della caratterizzazione fenotipica e molecolare degli M1, è stata saggiata la tossicità dei trattamenti singoli e combinati a differenti concentrazioni e tempi di incubazione tramite il saggio MTT, che ha consentito di individuare le dosi di trattamento migliori.

Dall'analisi dell'espressione delle citochine si evince un potente effetto pro-infiammatorio da parte dell'LPS (10 ng/ml) già dopo 3 ore dalla stimolazione, come mostrato dai livelli di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ; tuttavia è l'associazione di LPS con IFN- $\gamma$  che promuove il mantenimento del fenotipo pro-infiammatorio (M1) nel tempo. Si noti che, il trattamento con IFN- $\gamma$  preso singolarmente non sembra mostrare un effetto importante sull'espressione delle citochine. Pertanto, per successivi studi su modelli cellulari, è raccomandabile una associazione di LPS ed IFN- $\gamma$ , che conserva il fenotipo M1 in maniera prolungata.

Oltre alla concentrazione 10 ng/ml LPS è stata testata anche una seconda concentrazione di 40 ng/ml per saggiare l'ipotesi che una quantità maggiore di endotossina potesse prolungare la risposta pro infiammatoria dei macrofagi. Tuttavia, i risultati mostrano che, nonostante la produzione di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a 24 ore sia maggiore, questa risposta non viene conservata nelle 48 ore, che, contrariamente da quanto atteso, ha mostrato livelli di espressione di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inferiori rispetto a quelli osservati con la dose 10 ng/ml.

Nel complesso, questi dati dimostrano come l'attivazione e la regolazione della risposta infiammatoria nei macrofagi sia finemente regolata non solo dalla concentrazione dei mediatori chimici, ma anche dal tempo di trattamento.

Nel nostro sistema, la combinazione di LPS e IFN- $\gamma$  è risultata, come atteso, più efficace nell'indurre le citochine pro-infiammatorie rispetto al solo LPS. L'IFN- $\gamma$  utilizzato come

unico stimolo non promuove un'efficace induzione della risposta infiammatoria. Pertanto, questi risultati definiscono come modello efficace della polarizzazione degli M0 in M1, l'associazione di LPS e IFN- $\gamma$ . Tale polarizzazione viene anche mantenuta per un tempo sufficiente da consentire ulteriori futuri trattamenti per lo studio dell'attività dei macrofagi M1.

Il trattamento con IL-4 e IL-13 per la polarizzazione verso il fenotipo M2, anti-infiammatorio, presenta un incremento rilevante del TGF- $\beta$  a 72 ore dalla stimolazione rispetto al controllo non trattato, risultato importante per valutare il processo di polarizzazione, poiché, come spiegato nell'introduzione, questa citochina ha un ruolo molto importante nei processi anti-infiammatori e riparativi propri delle cellule M2. Tuttavia, il protocollo di polarizzazione M0-M2 presenta un limite dato dal fatto che la IL-10 non aumenta significativamente a seguito della stimolazione degli M0 quando in realtà questa citochina anti-infiammatoria viene tipicamente espressa dalle cellule M2.

Tuttavia, recenti studi riguardanti la polarizzazione M2 suggeriscono che la IL-10 venga espressa durante le prime fasi del processo con funzione inibitoria dell'attività pro infiammatoria. Poiché l'analisi di espressione dell'IL-10 è stata effettuata dopo 72 ore dal trattamento con IL-4 e IL-13, questa citochina potrebbe essere stata espressa ma non rilevata. La sua espressione nel tempo verrà perciò analizzata in laboratorio nel prossimo futuro.

Complessivamente l'allestimento delle sottopopolazioni macrofagiche risulta quasi ultimato: tuttavia oltre all'espressione dell'IL-10 dovrà essere valutata l'espressione proteica di tutti i marcatori, e soprattutto quella della IL-6, i cui livelli di mRNA non vengono significativamente rilevati, sia nelle cellule non differenziate che in quelle differenziate. In particolare, l'analisi di espressione della IL-6 verrà analizzata sia come proteina intracellulare, che come citochina rilasciata nel mezzo condizionato; in quest'ultimo caso verrà eseguito un test ELISA.

In conclusione, questo studio ha permesso di definire le condizioni per ottenere sottotipi macrofagici che siano stabili nel tempo, e quindi permetterà di proseguire le indagini per le quali questo protocollo è stato allestito, ovvero dimostrare l'ipotesi di una capacità di apprendimento e di acquisizione di memoria immunologica delle cellule dell'immunità innata.

## Bibliografia e sitografia

1. **Chen L. et al.** Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. **2017**, *14*, 7204-7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208
2. **Bannenberg G. ; Serhan C.N.** A Novel Genus of Specialized Anti-Inflammatory and Pro-Resolution Lipid Mediators - Chapter 4. *NeuroImmune Biology*, Volume 9, **2010**. doi.org/10.1016/S1567-7443(10)70009-0
3. **Freire M.O. ; Van Dyke T.E.** Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000*. **2013** Oct;63(1):149-64. doi:10.1111/prd.12034
4. **Li D. ; Wu M.** Pattern recognition receptors in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6, 291. **2021**. doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0
5. **Mogensen TH.** Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. **2009**, Apr, 22(2):240-73, doi: 10.1128/CMR.00046-08
6. **Jang J.H. ; Shin H.W. et al.** An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. *Mediators Inflamm*. **2015**;2015:794143. doi: 10.1155/2015/794143
7. **Kany S. ; Vollrath J.T. ; Relja B.** Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci*. **2019** Nov 28; 20(23):6008. doi: 10.3390/ijms20236008
8. **Zhang J.M. ; An J.** Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. **2007** Spring;45(2):27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e
9. **Testar J.** Cytokines: Introduction. *British Society for Immunology*. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/receptors-molecules/cytokines-introduction>.
10. **Moraga I. ; Spangler J.** Multifarious determinants of cytokine receptor signaling specificity. *Adv Immunol*. **2014**;121:1-39. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00001-5
11. **Bartee E. ; McFadden G.** Cytokine synergy: an underappreciated contributor to innate antiviral immunity. *Cytokine*. **2013** Sep;63(3):237-40. doi: 10.1016/j.cyto.2013.04.036
12. **Idriss H.T. ; Naismith, J.H.** TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech*. **2000**. 50: 184-195. doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H
13. **Loonen A. J. M.** Putative role of immune reactions in the mechanism of tardive dyskinesia. *Brain, Behavior, & Immunity – Health*, Volume 33. **2023**. doi.org/10.1016/j.bbih.2023.100687
14. **Larry C. ; Borish M.D. ; Steinke J.W.** Cytokines and chemokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2003** doi:10.1067/mai.2003.108
15. **Kubiczkova L. ; Sedlarikova L.; Hajek R. et al.** TGF- $\beta$  – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* 10, 183 ; **2012**. doi.org/10.1186/1479-5876-10-183

16. **Iyer S.S. ; Cheng G.** Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease, *Crit. Rev. Immunol*, **2012**; 32(1):23-63. doi: 10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30
17. **Kotenko S.V.** The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002** Jun;13(3):223-40. doi: 10.1016/s1359-6101(02)00012-6
18. **David D. Chaplin.** Overview of the immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Feb **2010**,125(2 Suppl 2): S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980
19. **Goldman A.S. ; Prabhakar B.S.** *Medical Microbiology. 4th edition*, Baron S. editor.
20. **Kaufmann S.** Immunology's Coming of Age. *Front Immunol*. Apr 3 **2019**, 10:684. doi: 10.3389/fimmu.2019.00684
21. **Lokaj J. ; John C.** Ilya Ilich Metchnikov and Paul Ehrlich: 1908 Nobel Prize winners for their research on immunity. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*. **2008** Nov;57(4):119-24. PMID: 19069024
22. **Aristizábal B. ; González Á.** Innate immune system. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Bogota (Colombia).
23. **Marshall et al.** An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-018-0278-1>
24. **Netea M.G. et al.** Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host & Microbe Perspective* Volume 25, Issue 1P13-26 January 09, **2019**. doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006
25. **Jagannathan-Bogdan M. ; Zon L.I.** Hematopoiesis. *Development*. **2013** Jun;140(12):2463-7. doi: 10.1242/dev.083147
26. **Janeway C.A. Jr; Travers P. ; Walport M. et al.** The components of the immune system. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th edition, **2001** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27092/#>
27. **Smith B.R.** Regulation of hematopoiesis. *Yale J Biol Med*. **1990** Sep-Oct;63(5):371-80, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2589354/>
28. **LB. Nicholson.** The immune system. *Essays Biochem*. **2016** Oct 31;60(3):275-301. doi: 10.1042/EBC20160017
29. **Kloc M. ; Kubiak J.Z. et al.** Memory Macrophages *Int J Mol Sci*. **2022** Dec 20;24(1):38. doi: 10.3390/ijms24010038
30. **Fang X.H. ; Li Z.J. et al.** Macrophage memory: Types, mechanisms, and its role in health and disease. *Immunology*. **2024**; 171(1): 18–30. doi.org/10.1111/imm.13697
31. **Wu C. ; Xu Y. ; Zhao Y.** Two kinds of macrophage memory: innate and adaptive immune-like macrophage memory. *Cellular & Molecular Immunology*. **2022**. 19:852–854 doi.org/10.1038/s41423-022-00885-y

32. **Deng H. ; Maitra U. et al.** Molecular mechanism responsible for the priming of macrophage activation. *J Biol Chem.* **2013** Feb 8;288(6):3897-906. doi: 10.1074/jbc.M112.424390
33. **Nilsonne G. ; Appelgren A. ; Axelsson J. et al.** Learning in a simple biological system: a pilot study of classical conditioning of human macrophages in vitro. *Behav Brain Funct* 7, 47 ; **2011**. doi.org/10.1186/1744-9081-7-471
34. **Varol C. ; Mildner A.; Jung S.** Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu. Rev. Immunol.* **2015**. 33:643–75. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220
35. **Gordon S.** The macrophage: Past, present and future. *European Journal of Immunology.* **2007**. doi.org/10.1002/eji.200737638
36. **Lendeckel U. ; Venz S. ; Wolke C.** Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts.* **2022**;8(2):12.. doi.org/10.1007/s40828-022-00163-4
37. **Mass E. ; Nimmerjahn F. ; Kierdorf K. et al.,** Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nat. Rev. Immunol* 23, 563–579, **2023**. doi.org/10.1038/s41577-023-00848-y
38. **Sieweke M.H. ; Allen J.E.** Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. *Science.* **2013**;342. doi: 10.1126/science.1242974
39. **Watanabe S. ; Alexander M. ; Misharin A.V. ; Budinger G.R.S.** The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 20 May **2019**;129(7):2619-2628. doi: 10.1172/JCI124615
40. **Espinoza V.E. ; Emmady P.D.** Histology, Monocytes. *StatPearls.* **2023**  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557618/>
41. **Italiani P. ; Boraschi D.** From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* 17 October **2014**. doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514
42. **Hirayama D. ; Iida T. ; Nakase H.** The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci.* **2017** Dec 29;19(1):92. doi: 10.3390/ijms19010092
43. **Luo M. ; Zhao F. et al.** Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases. *Front Immunol.* **2024** Apr 10;15:1352946. doi: 10.3389/fimmu.2024.1352946
44. **Chen S. ; Saeed, A.F. ; Liu, Q. et al.** Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* 8, 207; **2023**. doi.org/10.1038/s41392-023-01452-1
45. **Mosser D. ; Edwards, J.** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969 ; **2008**. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
46. **Lee C.H. ; Choi E.Y.** Macrophages and Inflammation. *Journal of Rheumatic Diseases* Vol. 25, No. 1, January, **2018**. doi.org/10.4078/jrd.2018.25.1.11
47. **Zhao W. ; Ma L. et al.** M2 macrophage polarization: a potential target in pain relief. *Front Immunol.* **2023** Aug 29;14:1243149. doi: 10.3389/fimmu.2023.1243149.
48. **ATCC,** - <https://www.atcc.org/products/tib-202>

49. **Composition of RPMI 1640 w/ L-Glutamine, -**  
[https://www.euroclonegroup.it/documents/documents/ECB2000\\_3102\\_.pdf](https://www.euroclonegroup.it/documents/documents/ECB2000_3102_.pdf)
50. **Thermo Fisher Scientific Inc.** The Basics of Fetal Bovine Serum Use in Cell Culture.  
<https://www.thermofisher.com/it/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment/culture-media/fbs-basics.html>
51. **L-Glutamine (200 mM).** Thermo Fisher Scientific Inc.  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/25030081>.
52. **Thermo Fisher Scientific Inc.** Penicillin-Streptomycin (5,000 U/mL).  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15070063>
53. **Thermo Fisher Scientific Inc.** 2-Mercaptoethanol  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21985023>
54. **PMA.** Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/search/pma-pkc?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=pma%20pkc&type=product>.
55. **Baxter et al.** Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN $\gamma$ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *Journal of Immunological Methods*. doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721
56. **Feng D. et al.** IL-4-induced M2 macrophages inhibit fibrosis of endometrial stromal cells. *Reproductive Biology*. doi.org/10.1016/j.repbio.2023.100852
57. **Phuangbubpha P. ; Thara S. et al.** Optimizing THP-1 Macrophage Culture for an Immune-Responsive Human Intestinal Model. *Cells*. **2023** May 19;12(10):1427. doi:10.3390/cells12101427
58. **Tarasova N. K. ; Ytterberg A. J. et al.** Proteomics Reveals a Role for Attachment in Monocyte Differentiation into Efficient Proinflammatory Macrophages. *Journal of Proteome Research*. July **2015**. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00659
59. **Smith T. D. ; Tse M. J. et al.** Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals. *Integrative Biology*, Volume 8, Issue 9, Sept. **2016**. doi.org/10.1039/c6ib00105j
60. **Gonçalves M. ; Cappellari A. R.** Effect of LPS on the Viability and Proliferation of Human Oral and Esophageal Cancer Cell Lines. *Human and Animal Health*. **2016** doi.org/10.1590/1678-4324-2016150485
61. **Tamai R. ; Sugawara S.** Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression . *Sage Journals*. **2003**.
62. **Oh M. H.; Jang J. ; Lee J. H.** Polarization of THP-1-Derived Macrophage by Magnesium and MAGT1 Inhibition in Wound Healing. *Arch Plast Surg*. **2023** Aug 2;50(4):432-442. doi: 10.1055/s-0043-1770114

63. **Young L. ; Sung J. ; Stacey G. et al.** Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc* 5, 929–934 ; **2010**. doi.org/10.1038/nprot.2010.43
64. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
65. **Yasin et al.** Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation Volume* 128, November–December **2022**, Pages 67-82. doi.org/10.1016/j.diff.2022.10.001
66. **Gottfried E. ; Kunz-Schughart L.A.** Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol*. **2008** May;67(5):453-63 doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x
67. **Yasin et al.** Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation Volume* 128, November–December **2022**. doi.org/10.1016/j.diff.2022.10.001
68. **Franck E. S. M. ; Jasmyne A.** The glia club: Validation of polarization biomarkers for human microglia (HMC3) using quantitative real time RT-qPCR. *BioRxiv*. **2024**. doi.org/10.1101/2024.09.26.615202

# Ringraziamenti

*Anzitutto desidero esprimere il mio più sincero ringraziamento alla Professoressa Maria Rita Rippono per il prezioso supporto durante tutto il mio lavoro di tesi.*

*Un grazie infinito va a Lorenza, senza la quale il mio traguardo non sarebbe stato lo stesso. Grazie per la cura e la dedizione riposte nell'accompagnarmi in questi mesi, per la pazienza con cui hai affrontato insieme a me ogni errore e per aver sempre creduto in me.*

*Grazie a tutte le splendide ragazze del laboratorio di Patologia Clinica, per l'aiuto che non mi hanno fatto mai mancare e per i tanti insegnamenti e consigli che custodirò con cura nel mio percorso.*

*Un doveroso ringraziamento va alle Professoresse Marinella Balercia e Lucia Bisceglie, che durante il percorso sono state per me un punto di riferimento costante ed affidabile*

*Un pensiero speciale va a Claudia, Martina, Alessia, Francesca e Rebecca. Grazie per esservi rivelate amiche non solo nei momenti più gioiosi ma soprattutto in quelli più tesi, per aver condiviso insieme la spensieratezza durante un viaggio che, senza di voi sarebbe stato una sfida molto più dura.*

*Cara Anna, non so se oggi sarai qui con me a festeggiare, ma per te so che un solo grazie è poco. Fin dall'inizio hai scelto di sostenermi e di appoggiarmi vedendo in me un potenziale che ad oggi non sono ancora così convinta di avere. Farò tesoro di tutti i tuoi consigli, della tua visione delle cose e dell'amore con cui per una vita hai svolto il tuo lavoro, con la speranza di renderti sempre fiero di me.*

*Un grazie forse scontato ma assolutamente dovuto va alla mia famiglia: mio padre mia madre e mia sorella Arianna, per essere da sempre dalla mia parte a tifare per me. A te mamma va il mio riconoscimento più grande: hai passato così tanti pomeriggi ad ascoltarmi ripetere che meriteresti una laurea anche tu. Grazie per tutte le volte che mi hai visto rimanere incastrata nelle mie ansie e paure, che solo tu, col tuo modo di fare, hai saputo allontanare.*

*Grazie ai miei super nonni per la loro silenziosa ma costante presenza e per non desiderare nient'altro se non la mia felicità.*

*Grazie a Cla, Marti, Cati, Ale e Vane, le mie migliori amiche da sempre. Persone estremamente leali e sincere, con le quali sentirmi me stessa non è mai stato difficile. Insieme abbiamo attraversato i momenti più belli e spensierati e le scelte più importanti, sempre consapevoli che il nostro legame sarebbe andato oltre le distanze geografiche. Oggi non so se sarete tutte qui fisicamente, ma di certo il vostro pensiero sarà tale da azzerare i chilometri che ci separano.*

*Grazie a Giulia. Da semplice vicina di banco sei diventata una splendida confidente e amica. Con te è iniziato questo percorso, e con te insieme lo terminiamo. Un augurio a noi e alle tante avventure che affronteremo ancora insieme.*

*Ultimo ma non per importanza, grazie a Giacomo. Sei entrato nella mia vita quando l'amore era l'ultima cosa che andavo cercando, portando con te la felicità e la serenità che mai mi hai fatto mancare. Grazie per la tua grande pazienza, per la tua presenza e per la tua infinita dolcezza, per capire ogni mio istante e per essere pronto a gioire ad ogni mio successo. Non ti prometto che sarà sempre facile ma, un passo alla volta, faremo in modo che tutto lo diventi.*

*Infine, grazie a me stessa, al mio essere così insicura ma caparbia, che mi ha sempre permesso di raggiungere ogni mio obiettivo.*